

- TARTU RIIKLIKU ÜLIKOOLI
TOIMETISED
- УЧЕНЫЕ ЗАПИСКИ ТАРТУСКОГО
ГОСУДАРСТВЕННОГО УНИВЕР-
СИТЕТА
- ACTA ET COMMENTATIONES
UNIVERSITATIS TARTUENSIS

3 8 3

TARTU
1976

TSÜTOLOOGIA- JA GENEETIKA- ALASED TÖÖD

ТРУДЫ ПО ЦИТОЛОГИИ И ГЕНЕТИКЕ

I

Исправления

В статье Х. Каллак "О морфологии и делении ядер растительных клеток в условиях культуры ткани" переставлены рисунки I и 7.

TARTU RIIKLIKU ÜLIKOOLI TOIMETISED
УЧЕНЫЕ ЗАПИСКИ
ТАРТУСКОГО ГОСУДАРСТВЕННОГО УНИВЕРСИТЕТА
ACTA ET COMMENTATIONES UNIVERSITATIS TARTUENSIS
ALUSTATUD 1893.a. VIHIK 383 ВЫПУСК ОСНОВАНЫ В 1893.g.

TSÜTOLOOGIA- JA GENEETIKA-
ALASED TÖÖD

ТРУДЫ ПО ЦИТОЛОГИИ
И ГЕНЕТИКЕ

I

TARTU 1976

Редакционная коллегия:

**Х.Каллак (пред.), А.Хейнару,
М.Вийкмаа.**

Ответственный редактор К.Пылдвере

О ЦИТОЛОГИЧЕСКОЙ РЕАКТИВНОСТИ ВЛАГАЛИЩНОГО ЭПИТЕЛИЯ В ТКАНЕВОЙ КУЛЬТУРЕ

М. Вийкмаа

Эстрогенные гормоны и витамин А вызывают противоположные по направлению дифференцировки влагалищного эпителия как *in vivo* так и в органотипических культурах /1,2/. О действии же этих факторов на клетки влагалищного эпителия в тканевых культурах данные в литературе отсутствуют.

Задачей настоящей работы является изучение цитологических реакций эпителиальных клеток в однослойной зоне роста культуры кусочковых эксплантатов влагалища в присутствии эстрогена или витамина А. Для объяснения некоторых явлений действия витамина А мы изучали воздействие охлаждения и гидрокортизона на эти же культуры. Общая характеристика роста и цитологических свойств культуры влагалищного эпителия щенка приведена в одной из предыдущих работ автора /3/.

Материал и методика

Культивировались влагалищные эксплантаты щенков I-2-недельного возраста (12 серий по 60 культур) по методике, описанной в /3/.

Эстрон (спиртовой раствор в концентрации 0,2 мкг/мл среды) и витамин А (масляный или спиртовой раствор - 10 ед./мл) прибавляли к культуральной среде с начала культивации или в разные сроки после фазы пролиферации культуры. Охлаждению подвергались культуры после фазы пролиферации (на 7-ой день) в течение суток при температуре 16°C; затем они переносились обратно в нормальную температуру для культивации (37°C). Часть из культур охлаждалась в среде, содержащей гидрокортизон в концентрации 10 мкг/мл. Перед обратной инкубацией охлажденные культуры разделились на 4 группы:

1) инкубация в нормальной среде; 2) инкубация в среде, содержащей эстрон; 3) инкубация в течение 15 минут при 37°C в высококонцентрированном растворе витамина А (200 ед./мл),

ватам в нормальной среде; 4) инкубация в среде, содержащей гидрокортизон.

Культуры изучались в разные сроки культивации витально и при помощи различных методов гистологической и гистохимической обработки /3/.

Результаты и обсуждение

Действие эстрогена на клетки культуры. В присутствии эстрогена не наблюдалось изменений в общем характере роста культуры. Зато обнаруживались четкие изменения морфологических и цитохимических свойств клеток, причем по выражению этих реакций клеточный состав культуры очень гетерогенный. Характер реакций клеток указывал на повышенный рибонуклеиновый, белковый и липидный анаболизм по сравнению с контрольными культурами. Так, ядра и ядрышки нередко оказывались увеличенными, количество ядрышек повышенным, цитоплазма обнаруживала большую базофильность и структурированность, тонофибриллы выявлялись раньше, чем в контрольных культурах. Клетки содержали повышенное количество липидных и фосфолипидных включений (рис. 1, 2) и лизосом (рис. 3). Эти наблюдения совпадают с литературными данными о действии эстрогенов на ткани-мишени (влагалище и матку) *in vivo* /4-8/. По современным представлениям, способность к реагированию эстрогенам зависит от присутствия специфических белков-рецепторов в компетентных клетках /9-12/. Эстрогены регулируют синтетическую активность клеток на уровне транскрипции /6,12,13/, а может быть, и на уровне трансляции /5,14/. Наши данные показывают, что эпителиальные клетки влагалища сохраняют свою функциональную компетентность к действию эстрогена в условиях роста в тканевой культуре. Явления дифференцировки влагалищного эпителия в условиях тканевой культуры значительно подавлены /3/, и эстроген не вызывает выраженных изменений в этом отношении.

Существует мнение, что в противоположность действию *in vivo*, эстрогены подавляют митотическую активность в тканевых культурах /15/. Но для доказательства этого положения почти нет данных относительно культур-мишеней для эстрогенов. Правда, Мейпалу и Кярнер /16/ обнаруживали подавление мито-

тического коэффициента при длительном воздействии эстрогена на культуры миометрия и миомы человека. Никиторова /17/, однако, наблюдала повышение количества митозов эпителиальных клеток в культуре молочных желез мышей в присутствии эстрадиола. На культурах эмбриональных фибробластов и почечного эпителия показано, что низкие дозы эстрадиола стимулируют, а высокие дозы ингибируют митотическую активность после однократного введения гормона в культуру /18/.

В наших опытах направление изменения митотической активности культуры обнаруживало зависимость от длительности воздействия эстрогена. При длительном действии митотический коэффициент культуры оказался подавленным (например, на 16-й день культивации от $4,58 \pm 0,27$ в контроле до $2,96 \pm 0,18\%$, $P < 0,01$). В это же время увеличивалась частота многоядерных клеток, нередко наблюдались аномальные (кольцеобразные, сегментированные) ядра (рис. 4). Если эстрон добавляли к среде на короткое время (от 12 до 24 часов) после фазы пролиферации культуры, то митотическая активность заметно повышалась (например, в 18-дневных культурах от $4,30 \pm 0,24$ до $14,82 \pm 0,42\%$, $P < 0,001$). В то же время увеличивалось и среднее количество ядрышек в клетках культуры (от $2,10 \pm 0,09$ до $2,71 \pm 0,13$, $P < 0,01$; рис. 5).

Действие витамина А на клетки культурн. При выращивании культур в среде, содержащей постоянно витамин А, характер роста культуры в общем не изменялся, но фаза дегенерации наступила раньше (уже через три недели культивации вместо 5-7 недель в нормальных условиях). Общий вид цитоплазмы клеток являлся сетчатым, сильно вакуолизированным, а базофилия была ослаблена. Клетки обнаруживали значительные изменения в разных структурных компонентах цитоплазмы, а также в некоторых цитохимических свойствах. Так, митохондрии укорачивались, утолщались и нередко фрагментировались; комплекс Гольджи гипертрофировался и часто распадался на фрагменты (рис. 6). Интенсивность реакции на кислую фосфатазу снижалась, количество лизосом резко уменьшалось. Нередко наблюдалось диффузное распределение продукта

реакции в цитоплазме, а больше всего в ядре и ядрышках. Четкая реакция на кислую фосфатазу выявлялась в комплексе Гольджи (рис. 3). Эти наблюдения хорошо объяснимы в свете лите-

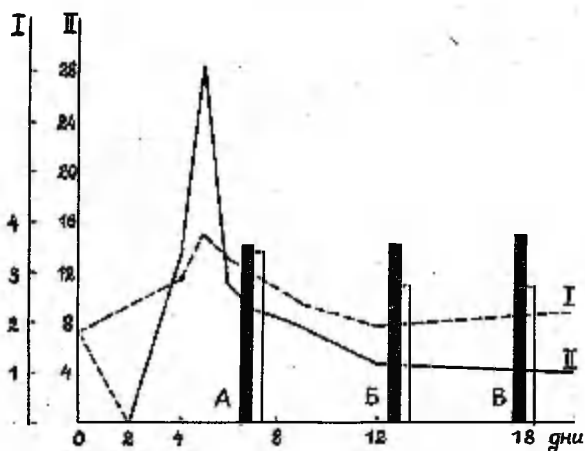


Рис. 5. Изменения частоты митозов и количества ядрышек в культурах:

I - среднее количество ядрышек и II - митотический коэффициент (МК %) в контрольной культуре (на оси абсцисс возраст культуры в днях); А и Б - МК (черные столбики и количество ядрышек (белые столбики) в культурах после 16-часового присутствия витамина А, В - МК и количество ядрышек в культуре после 18-часового присутствия эстрогена.

ратурных данных о разрушительном действии витамина А на разные клеточные мембраны, в частности на мембрану лизосом /19-21/.

Количество липидных и фосфолипидных включений при действии витамина А в клетках культуры сильно уменьшалось (рис. I, 2), реакция ШИК на полисахариды была, однако, всегда интенсивнее, чем в контрольных культурах. Как известно, витамин А усиливает синтез мукополисахаридов в различных тканях, являясь фактором, вызывающим ослизнение в эпителиях, в том числе в эпителии влагалища /22-24/. Хотя количество полисахаридов в клетках и повышалось, дифференцировки до секреции слизи в однослойной культуре нами не обнаружено.

В условиях культивации в среде, постоянно содержащей витамина А, митотический коэффициент культур снижен (например, на 6-ой день от $11,08 \pm 0,37$ до $7,27 \pm 0,32\%$, $P < 0,01$). При кратковременном действии (10-20 часов) число митозов, однако, увеличивалось (например, в 7-дневных культурах от $9,11 \pm 0,33$ до $14,03 \pm 0,44\%$, $P < 0,01$) с одновременным повышением среднего числа ядрышек (рис. 5). Стимулирующий эффект витамина А на митотическую активность показан и в культурах фибробластов /25,26/. Некоторые авторы предполагают, что влиянием на клеточные мембраны, в первую очередь на лизосомы, объясняется и большинство из физиологических эффектов витамина А /20,21,27/. Так как и низкие температуры повреждают лизосомальные мембраны /21/, мы изучали действие охлаждения на культуры для сравнения происходящих реакций клеток с реакциями, обнаруженными под влиянием витамина А.

Действие охлаждения на клетки культуры. Охлажденные культуры обнаруживали ослабленную базофильность и сильную вакуолизированность цитоплазмы большинства клеток. Наиболее значительные изменения наблюдались у мембранных компонентов клеток: митохондрии утолщены, комплекс Гольджи гипертрофирован, количество лизосом резко уменьшено. Преобладала диффузная реакция на кислую фосфатазу как в цитоплазме, так и в ядрах, в частности в ядрышках (рис. 7а). Эти изменения вполне сравнимы с последствиями длительного воздействия витамином А, хотя и являются более выраженными. Митозы в охлажденных культурах отсутствовали, количество ядрышек было уменьшено (в среднем от $3,00 \pm 0,12$

до $2,35 \pm 0,12$; $P < 0,001$).

Обратная инкубация охлажденных культур при 37°C в нормальной среде. В некоторых локальных участках зоны роста изменения, обнаруживавшиеся после охлаждения, стали еще более выраженными и эти клетки в конце концов дегенерировали (рис. 7д). В остальных клетках происходили процессы восстановления.

Самыми интересными являлись изменения по распределению продукта реакции на кислую фосфатазу. Диффузная реакция постепенно ослаблялась, прежде всего в ядрах. Сильную реакцию по этому ферменту приобретал, однако, комплекс Гольджи, и эта реакция усиливалась по мере убывания диффузной реакции в цитоплазме и ядре. Вокруг комплекса Гольджи возникали скопления гранул с фосфатазной активностью, т.е. лизосом (рис. 7б).

После 10-12 часов инкубации в преобладающей массе клеток диффузная реакция на кислую фосфатазу исчезла, а количество лизосом в клетках оказалось большим, чем в контрольных культурах (рис. 7в). Эти наблюдения согласуются с предположением, что интенсивное образование лизосом в поврежденных клетках связано с внутриклеточной репарацией /28/.

Первые митозы в охлажденных культурах обнаруживались после 8-часовой инкубации. Максимальная митотическая активность наступала на 10-11-ом часу ($\text{МК} = 13,90 \pm 0,41\%$; рис. 8). Эта величина значительно превышала митотический коэффициент контрольных культур ($\text{МК} = 6,38 \pm 0,33\%$; $P < 0,001$). В это же время увеличивалось и количество ядрышек, достигавшее максимума к 8-ому часу (среднее $3,15 \pm 0,11$; различие от контроля достоверно).

При инкубации охлажденных культур в присутствии эстрогена все восстановительные процессы ускорены. Быстро усиливалась базофилия, образование лизосом и, в частности, липидных и фосфолипидных включений (рис. 10). Митозы появлялись уже через

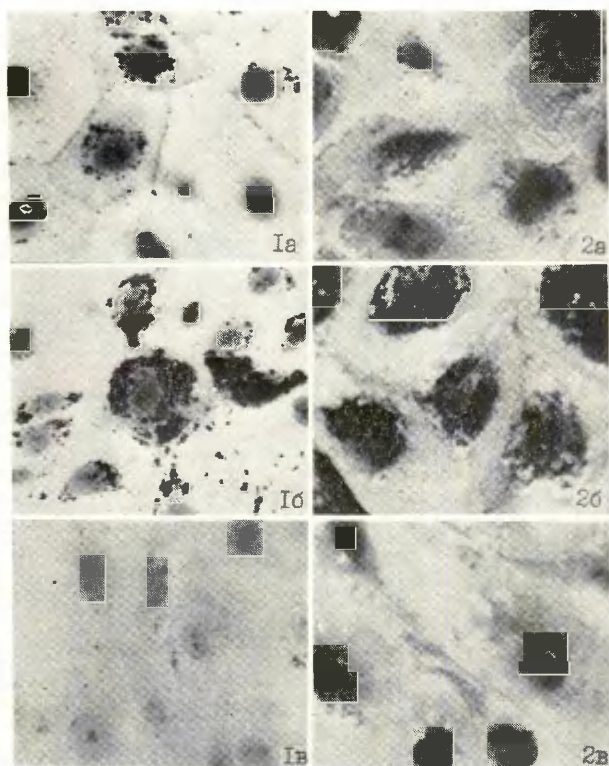


Рис. 1. Липидные включения в клетках 13-дневных культур: а) нормальная среда; б) присутствие эстрогена 20 час.; в) присутствие витамина А 20 час. Бэкер. Судан черный в пропиленгликоле. $\times 625$.

Рис. 2. Фосфолипидные включения в клетках 7-дневных культур: а) нормальная среда; б) присутствие эстрогена 16 час.; в) присутствие витамина А 16 час. Бэкер. Кислый гематеин по Бэкеру. $\times 625$.

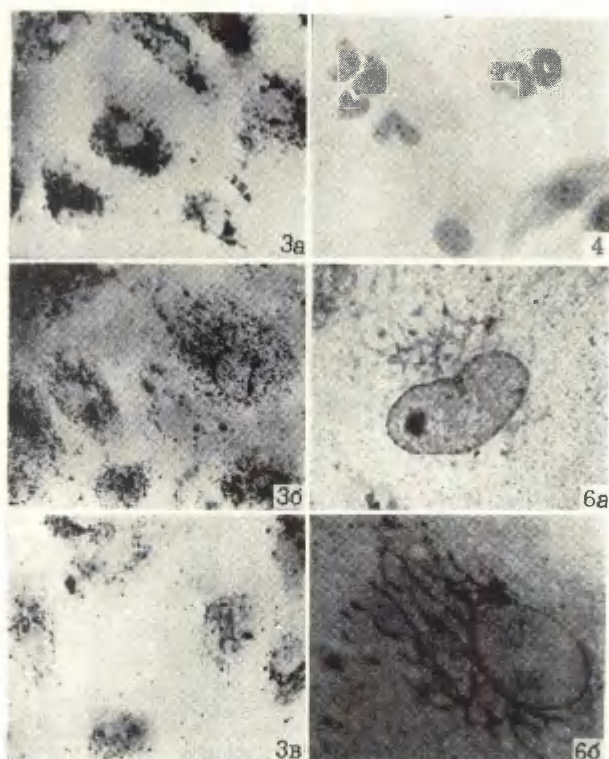


Рис. 3. Распределение активности кислой фосфатазы (лизосом) в клетках 7-дневных культур: а) нормальная среда; б) присутствие эстрогена 20 час.; в) присутствие витамина А 16 час. Бэкер. По Гомори в модификации Гольт. $\times 600$.

Рис. 4. Многоядерные клетки и кольцообразные ядра в 5-дневной культуре, выращенной в присутствии эстрогена. Карнуа. Гемалаун. $\times 612$.

Рис. 6. Комплекс Гольджи в клетках 8-дневных культур: а) нормальная среда; б) присутствие витамина А 16 час. Максимов. Осмирование по Колачеву в модификации Огава. $\times 2250$.

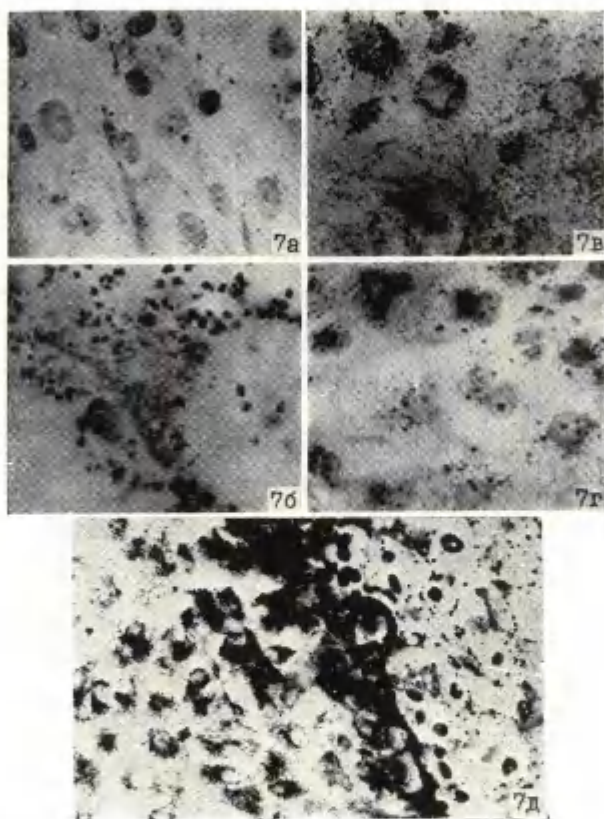


Рис. 7. Распределение активности кислой фосфатазы в клетках 8-дневных охлажденных культур: а) сразу после охлаждения. $\times 500$; б) после 6-часовой инкубации при 37°C , $\times 3000$; в) после 12-часовой инкубации при 37°C , $\times 500$; г) после действия витамина А и 12-часовой инкубации при 37°C , $\times 500$; д) после 10-часовой инкубации при 37°C , справа дегенерированный участок культуры. $\times 280$. Бэкер. По Гомори в модификации Гольт.

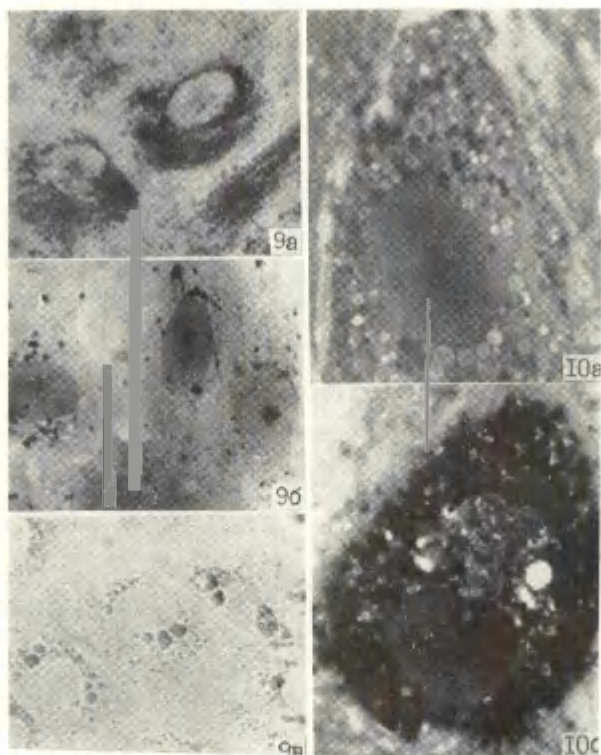


Рис. 9. Витальное окрашивание нейтральным красным (в течение 4 часов) клеток 8-дневных культур: а) нормальная культура; б) охлажденная культура; в) культура, охлажденная в присутствии гидрокортизона. $\times 1800$.

Рис. 10. Фосфолипидные включения в клетках 8-дневных охлажденных культур: а) после 8-часовой инкубации при 37°C ; б) после 8-часовой инкубации при 37°C в присутствии эстрогена. Бэкер. Кислый гематеин по Бэкеру. $\times 2700$.

4 часа, а максимальная частота митозов ($МК = 13,67 \pm 0,48\%$) наблюдалась через 8 часов инкубации (рис. 8). Следует отметить, что действие эстрогена в данном случае состоит в ускорении поступления клеток в митотическое деление, но не в уве-

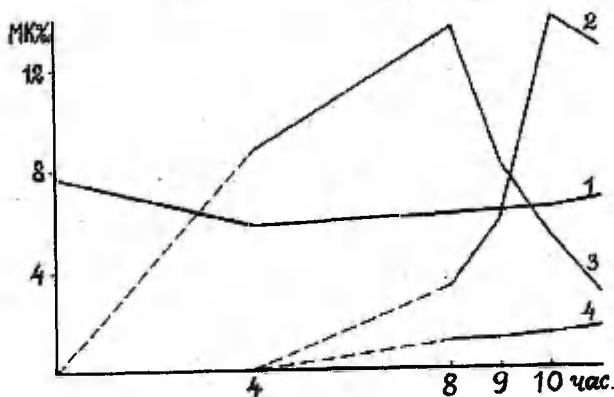


Рис. 8. Изменения частоты митозов (МК %) в 8-дневных культурах:

1 - контрольная культура, 2 - охлажденная культура при 37°C , 3 - охлажденная культура при 37°C в присутствии эстрогена, 4 - культура, охлажденная и инкубируемая в присутствии гидрокортизона.

личении общего количества делящихся клеток. Эти результаты объяснимы общим стимулирующим действием эстрогена на метаболизм клеток /6/.

При обработке охлажденных культур в и т а м и н о м А обнаруживалось долгое сохранение диффузной реакции на кислую фосфатазу и подавление образования лизосом (рис. 7г). Восстановление этих культур очень замедлено и затруднено; большие участки зоны роста или целые культуры дегенерировали. Митозы в этих культурах в течение наблюдений (12 часов) встречались очень редко.

Изменения, которым подвергаются клетки культур при длительном действии витамина А и охлаждения, в принципе очень сходны с явлениями паранекроза Насонова /29/. Так как одним из основных критериев паранекротических изменений клеток является потеря способности к гранулообразованию при витальном окрашивании и увеличение диффузной адсорбции, мы изучали характер накопления нейтрального красного (0,005%-ный раствор) клетками культуры. Обнаруживалось, что в культурах, подвергшихся охлаждению или длительному действию витамина А, резко подавлялось гранулярное накопление красителя и преобладало диффузное окрашивание цитоплазмы и ядер, в то время, когда в контрольных культурах наблюдалось интенсивное гранулообразование (рис. 9). Мы предполагаем, что ключевым механизмом в развитии паранекроза является повреждение лизосом с освобождением в цитоплазму и ядро гидролитических ферментов.

Эта точка зрения подтверждается опытами, в которых применялся г и д р о к о р т и з о н, известный как фактор, стабилизирующий мембраны лизосом /18,21,27/. При охлаждении культур в среде, содержащей гидрокортизон, разрушение лизосом оказалось резко подавленным; только в очень ограниченных участках обнаруживалась слабая диффузная реакция на кислую фосфатазу. Не наблюдалось заметных изменений ни митохондрий, ни комплекса Гольджи. В этих культурах выявлялось очень мало дегенеративных изменений при обратной инкубации. Такие изменения почти отсутствовали в случае, если инкубация после охлаждения проводилась в среде, также содержащей гидрокортизон. Окрашивание нейтральным красным в этом случае оказалось только гранулярным, хотя и очень ограниченным (рис. 9в). Таким образом, гидрокортизон, стабилизируя мембраны лизосом,

предохраняет клетки от повреждающих действий разных факторов. В таком случае, однако, не наблюдалось и повышения митотической активности в культурах, наоборот, она держалась ниже контрольного уровня (рис. 8). Некоторыми авторами поддерживается положение, по которому состояние лизосом (активность гидролитических ферментов) играет определенную роль в регуляции митотической активности клеток /30-34/. Наши данные согласуются с гипотезой Э. Аллисона /34/ о том, что лизосомные ферменты причастны к инактивации какого-то "репрессора", оказывающего подавляющее действие на митотическое деление клеток.

Выводы

1. Клетки влагалищного эпителия в тканевой культуре способны к реагированию на действие эстрогена с повышением анаболической активности и изменением частоты митозов.

2. Кратковременное действие витамина А стимулирует, длительное действие-подавляет митотическую активность культуры.

3. Длительное действие витамина А и охлаждение вызывают в принципе одинаковые паранекротические и деструктивные изменения клеток культуры, связанные с сильным повреждением лизосом.

4. Гидрокортизон сохраняет целостность лизосом, защищает клетки от повреждающих действий и подавляет митотическую активность культуры.

5. Состояния лизосом имеют значение в развитии процессов деструкции и репарации, а также в регуляции митотической активности клеток культуры.

Л и т е р а т у р а

1. Kahn H.H. Effect of locally applied vitamin A and estrogen on the rat vagina. - Amer. J. Anat., 1954, 95, 309-314.
2. Kahn H.H. Effect of oestrogen and of vitamin A on vaginal cornification in tissue culture. - Nature, 1954, 174, 317-318.
3. Вийкмаа М.Х. Цитологический анализ роста в первичных культурах влагалищного эпителия. - Арх. анат., 1969, 57, № 9, 68-76.

4. Bern H.A., Alfert M., Blair S.M. Cytochemical studies of keratin formation and of epithelial metaplasia in the rodent vagina and prostata. - J. Histochem.Cytochem., 1957, 5, 105-119.
5. Notides A. The estrogen-induced synthesis of a specific uterine protein. - J. Cell Biol., 1965, 27, 72A.
6. Hamilton T.H. Control by estrogen of genetic transcription and translation. - Science, 1968, 161, 649-661.
7. Файнберг В.Б., Мейпалу В.Э., Вийкмаа М.Х. Гистохимические изменения в матках и экспериментальных миомах морских свинок при длительном введении синэстрола. - Уч. зап. Тартуского гос. ун-та, 1973, 303, 142-156.
8. Steplewski Z., Waroński W. RNA synthesis in the uterine epithelium stimulated by estrogen injection. - Acta histochem., 1973, 47, 216-219.
9. Toft D., Gorski J. A receptor protein for estrogens: its isolation from the rat uterus and preliminary characterization. - J. Cell Biol., 1965, 27, 107 A.
10. Steggle A.W., Spelsberg T.C., Glasser S.R., O'Malley B.W. Soluble complexes between steroid hormones and target tissue receptors bind specifically to target-tissue chromatin. - Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1971, 68, 1479-1482.
11. Mešter J., Brunelle R., Jung I., Sonnenschein C. Estrogen-sensitive cells. Hormone receptors in tumors and cells in culture. - Expl.Cell Res., 1973, 81, 447-452.
12. Хесин Р.Б. Состояние вопроса о механизмах регуляции синтеза РНК у низших и высших организмов. - Успехи соврем. биол., 1972, 74, 2(5) 171-197.
13. Segal S.J. Role of RNA in the biologic action of estrogens. - Anat. Rec., 1964, 148, 334.
14. Geissler E., Bielka H. Regulation der Nukleinsäure- und Proteinbiosynthese. - In: Molekulare Biologie der Zelle. Herausgegeben von H.Bielka.VEB Gustav Fischer Verlag, Jena, 1973, 176-200.

15. Елифанова О.И. Гормоны и размножение клеток. М., "Наука", 1965.
16. Мейпалу В.Э., Кярнер Ю.К. О влиянии эстрогена на клетки миомы и окружающей ее мышечной ткани матки в тканевой культуре. - Цитология, 1968, 10, № 8, 1052-1057.
17. Никифорова Е.Н. Особенности роста в культурах тканей молочной железы мышей нераковой линии (Д) при добавлении андростерона и эстрадиола-17 β в питательную среду. - Бюлл. эксп. биол. мед., 1960, № 6, 92-97.
18. Серова И.А., Керкис Ю.Я. Цитогенетический эффект некоторых стероидных гормонов и изменение активности лизосомных ферментов in vitro. - Генетика, 1974, 10, № 3, 142-149.
19. Dingle J.T. Action of vitamin A on the stability of lysosomes in vivo and in vitro. - In: Lysosomes. Ciba Found. Symp. London, 1963, 384-404.
20. Lucy J.A. Membrane permeability and the control of cellular function. - In: Metabolic control mechanisms in animal cells. Nat. Cancer Inst. Monograph, 1964, 13, 93-107.
21. Weissmann G. Labilization and stabilization of lysosomes. - Fed. Proc., 1964, 23, 1038-1044.
22. Barker S.A., Cruickshank C.N.D., Webb T. The effect of vitamin A, hydrocortisone and citral upon sulphate metabolism in skin. - Exp. Cell Res., 1964, 35, 255-261.
23. Lawrence D.J., Bern H.A. Vitamin A and mucous metaplasia. In: Mucous secretions. Ann. New York Acad. Sci., 1963, 106, 2, 646-653.
24. Вийкмаа М.Х. Изменения влагалищного эпителия в органоטיפических культурах. Уч. зап. Тартуского гос. ун-та, 1966, 189, 89-94.
25. Baker L.E. Effect of vitamin A on proliferation of fibroblasts. - Proc. Soc. exptl. Biol. Med., 1935/36, 33, 124-126.

26. Lasnitzki I. The effect of excess vitamin A on mitosis on chick heart fibroblasts in vitro. - Exp. Cell Res., 1955, 8, 121-125.
27. Allison A. The role of lysosomes in the action of drugs and hormones. - Adv. chemotherapy, 1968, 3, 253-302.
28. Шкурупий В.А. К вопросу о роли лизосом в реакции паренхиматозных клеток печени на повреждение. - Цитология и генетика, 1974, 8, № 3, 233-236.
29. Насонов Д.Н. Некоторые вопросы морфологии и физиологии клетки. М.-Д., Изд. АН СССР, 1963.
30. Adams R.L.P. Periodic activation of lysosomal enzymes during regeneration of the liver. - Biochem. J., 1963, 87, 532-556.
31. Allison A.C., Mallucci L. Lysosomes in dividing cells with special reference to lymphocytes. - Lancet, 1964, 2, 1371-1373.
32. Sarkany I., Caron G.A. Effect of phytohaemagglutinin on guineapig skin in vivo. Nature, 1966, 210, 5031, 105-106.
33. Hirschhorn R., Kaplan J.M., Goldberg A.F., Hirschhorn K., Weissmann G. Acid phosphatase-rich granules in Reiman lymphocytes induced by phytohemagglutinin. - Science, 1965, 147, 55-57.
34. Аллисон Э. Лизосомы и болезни. - В кн.: Молекулы и клетки. М., 1969, вып. 4, 196-213.

On Cytological Reactivity of Vaginal Epithelium
in Tissue Culture

M. Viikmaa

S u m m a r y

Morphological and cytochemical reaction of epithelial cells in monolayered growth zone of primary cultures from the vaginal explants of 1...2-week old dogs were investigated.

It was observed that the addition of estrone to the culture medium (0,2 g/ml) increased the content of RNA, protein and lipids, as well as the number of nucleoli and lysosomes in the cells. A brief-time (16...24 hr) exposure to estrone stimulated the mitotic rate of the cultures, whereas a long-time one caused the suppression of that.

Under the influence of vitamine A (10 u./ml), especially after a prolonged treatment, the cells revealed marked damages of membranous structures (lysosomes, Golgi complex, mitochondria), and an appearance of diffuse activity of acid phosphatase, as well as a decrease of basophilia and the content of lipids. A brief-time (10...20 hr) treatment with vitamin A stimulated, whereas a long-time one (over 24 hr) reduced the mitotic activity in the cultures.

The chilling of cultures (at 16° C for 24 hr) called forth destructive and paranecrotic changes in the cells, similar to those noticed after a long-time treatment with vitamin A. After the replacement of cultures to the normal growth temperature (37° C) an intense formation of new lysosomes and a marked increase of mitotic rate was evident. In the presence of estrone the reparation processes of cultures are accelerated.

Hydrocortisone (10 g/ml) prevented the damage of lysosomes and the paranecrotic changes of cells by chilling, and suppressed the increase of mitotic activity after chilling.

The findings are in line with the hypotheses that the reactions of lysosomes have a significant role (1) in the processes of intracellular destruction and reparation, and (2) in the regulation of mitotic activity of cells.

ХАРАКТЕРИСТИКА ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНО ВЫЗВАННЫХ АЛЬТЕРНАТИВНЫХ ДИФФЕРЕНЦИРОВОК ВЛАГАЛИЩНОГО ЭПИТЕЛИЯ У КРЫС

М. Вийкмаа

Влагалищный эпителий большинства млекопитающих является так называемой переменной тканью (Wechselgewebe) /1,2/. В ходе репродуктивного цикла он претерпевает, в частности у грызунов, обратимые фазоспецифические изменения дифференцировки между состояниями плоского и призматического многослойного эпителия /2,3/. В этих превращениях проявляется бифункциональность влагалищного эпителия: продукция кератина или слизи /1,2,4,5/.

Фазовые превращения дифференцировки влагалищного эпителия, называемые некоторыми авторами циклической метаплазией /1,2/, обусловлены циклической продукцией яичниками гормонов: эстрогенов и прогестерона /6-8/. Многими работами, однако, показано, что альтернативные дифференцировки влагалищного эпителия вызываются в экспериментальных условиях и некоторыми другими факторами. Так, кератинизация возникает при авитаминозе А /9-11/. Ослизнение влагалищного эпителия обнаруживается при введении андрогенного гормона тестостерона /3,4/, высоких доз витамина А /12/ и при действии рентгеновского излучения /13,14/. Слизистая дифференцировка эпителия вызывается этими факторами, как и прогестероном, несмотря на присутствие эстрогенов /12-17/.

До настоящего времени не проведено обобщающих сравнительных исследований по дифференцировке влагалищного эпителия, подвергшегося действию различных кератинизирующих и муцифицирующих факторов. В настоящей работе излагаются данные по изучению характера и условий альтернативной дифференцировки влагалищного эпителия крыс и обсуждаются возможные механизмы таких дифференцировок.

Материал и методика

Опыты выполнялись на белых крысах-самках. Распределение животных по опытам показано в таблице I.

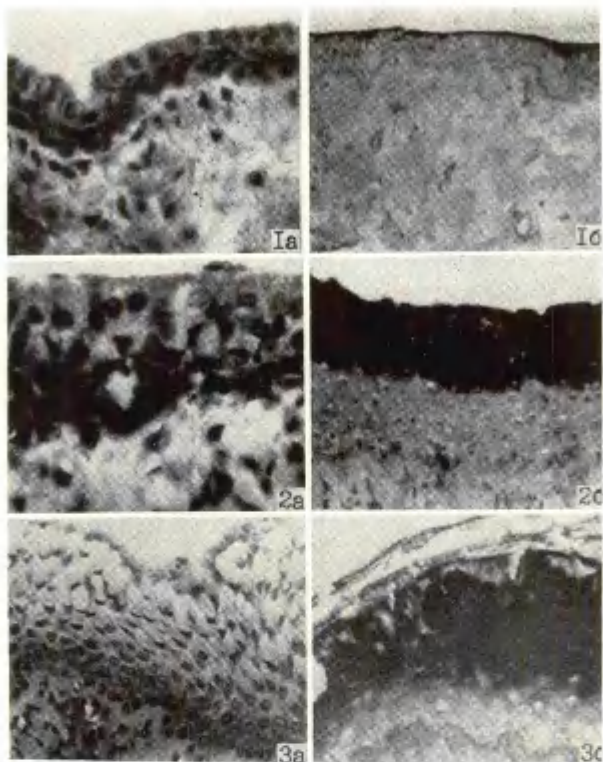


Рис. 1. Гипопластический слизистый эпителий влагалища: а) неполовозрелая крыса. Карнуа. Гематоксилин-эозин. $\times 800$; б) овариэктомированная крыса. Карнуа. ШИК-реакция. $\times 500$.

Рис. 2. Гиперпластический двухзоновый ослизнённый эпителий: а) кастрация, введение витамина А 7 дней. Карнуа. Гематоксилин-альциановый синий. $\times 1250$; б) кастрация, введение прогестерона 7 дней. Карнуа. ШИК-реакция — гематоксилин. $\times 500$.

Рис. 3. Гиперпластический трехзоновый ослизнённый эпителий: а) кастрация, введение прогестерона и синэстрола 14 дней. Максимов. По Ван Гизону. $\times 500$; б) кастрация, введение прогестерона и эстрогена 7 дней. Карнуа. ШИК-реакция — гематоксилин. $\times 500$.

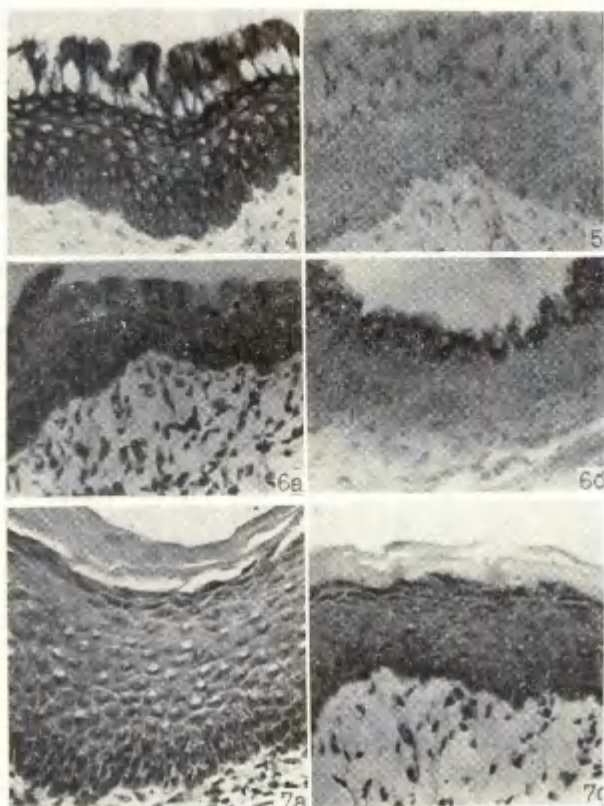


Рис. 4. Распределение белков в ослизненном влагалищном эпителии. Кастрация, введение витамина А 4 дня. Карнуа. По Даннелли в модификации Шубича. $\times 500$.

Рис. 5. Распределение нуклеиновых кислот в ослизненном эпителии. Кастрация, введение прогестерона 7 дней. Карнуа. Галлоцианин. $\times 500$.

Рис. 6. Переходное состояние влагалищного эпителия. Кастрация, введение эстрогена один день. а) Максимов. По Ван Гизону. $\times 600$; б) Карнуа. ШИК-реакция — гематоксилин. $\times 500$.

Рис. 7. Эстрогенное ороговение влагалищного эпителия у кастрированных крыс: а) введение эстрогена 4 дня. Карнуа. Гемаксиллин-эозин. $\times 500$; б) введение эстрогена 14 дней. Максимов. По Ван Гизону. $\times 500$.

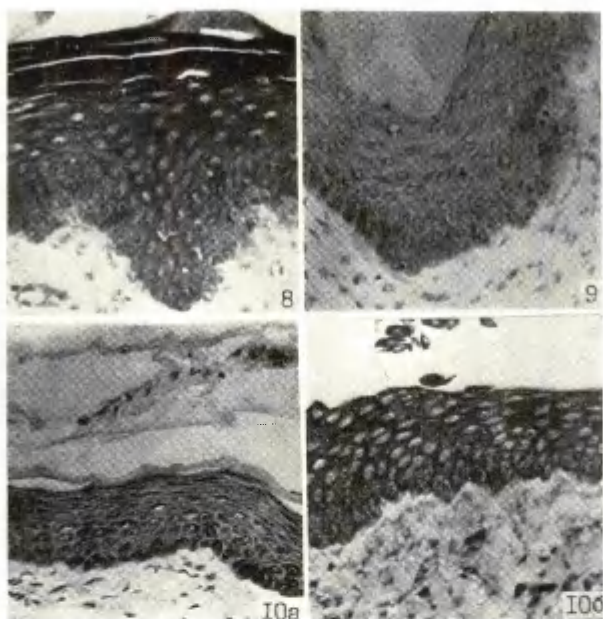


Рис. 8. Распределение белков в ороговевающем влагалищном эпителии. Кастрация, введение эстрогена 4 дня. Карнуа. По Даниелли в модификации Шубича. $\times 500$.

Рис. 9. Распределение нуклеиновых кислот в ороговевающем влагалищном эпителии. Кастрация, введение эстрогена 4 дня. Карнуа. Галлоцианин. $\times 500$.

Рис. 10. Влагалищный эпителий неполовозрелых крыс под действием гидрокортизона: а) введение гидрокортизона 4 дня. Максимов. По Ван Гизону. $\times 500$; б) введение гидрокортизона и прогестерона 4 дня. Карнуа. По Даниелли в модификации Шубича. $\times 500$.

Т а б л и ц а I
Характеристика проведенных опытов

Группы животных	Содержание опыта	Количество животных	Сроки исследования (дни)
взрослые интактные			
в фазе диэструса	контроль	5	
в фазе проэструса	контроль	5	
в фазе эструса	контроль	5	
беременные	контроль	5	
небеременные	+витамин А	10	7,14
взрослые кастрированные	контроль	5	2I
	+эстроген	25	2I + I,4,7,14,2I
	+прогестерон	20	2I + I,4,7,14
	+прогестерон и эстроген	20	2I + I,4,7,14
	+витамин А	25	2I + I,4,7,14,2I
инфантильные интактные	контроль	5	
	+эстрон	6	4,7
	+прогестерон	6	4,7
	+тестостерон	9	I,4,7
	+гидрокортизон	9	I,4,7
	+гидрокортизон и прогестерон	6	4,7
Всего:		I66	

Изучаемые факторы дифференцировки вводились подкожно в растворе растительного масла через каждые два дня. Однократная доза для взрослых животных (около 200 г) составляла 5 мкг эстрогена (или 2 мкг синэстрола), 2 мг прогестерона или 15 мг (50000 ед.) витамина А в 0,5 мл раствора, для 3-4-недельных крысят - 1 мкг эстрогена, 0,5 мг прогестерона, 0,5 мг тестостерона или 2,5 мг гидрокортизона в 0,2 мл раствора.

Животных забивали в одно и то же время дня (между 14 и 16 часами) ударом в затылок через разные сроки с начала

инъекций (см. табл. I). Для исследования вырезали среднюю треть, иногда и концевые отделы влагалища. Материал фиксировали в смесях Карнуа, Максимова и Бакера, готовили парафиновые и замороженные срезы.

Препараты окрашивали гематоксилин-эозином и по Ван-Гизону. Общий белок определяли по Даниелли в модификации Шубича /18/, кератин по Шубичу /19/. Полисахариды и слизь выявляли реакцией ШМК или альциановым синим. Нуклеиновые кислоты определяли галлоцианином или по Браше и Фельгену. Активность кислой фосфатазы выявляли по Гомори в модификации Гольт /20/.

Результаты исследований

И с х о д н ы й э п и т е л и й. Влагалище как у неполовозрелых, так и у взрослых овариэктомированных крыс выстлано гипопластическим 2 - (4)-слойным призматическим (кубическим или низкоклиндрическим) эпителием со слабо выраженной секрецией слизи (рис. I). В базальном слое встречаются редкие митозы ($МК < 1,0\%$). Содержание белков умеренное и равномерное во всем эпителиальном пласте как в цитоплазме, так и в ядрах. Реакция на РНК слабая, более интенсивно проявляется в поверхностном слое. Ядра обнаруживают одинаковую фельген-реакцию во всех слоях. Активность кислой фосфатазы слабая; в базальном слое наблюдается преимущественно диффузное (в том числе и в ядрах), в поверхностных слоях - гранулярное распределение продуктов реакции.

И н д у ц и р о в а н н о е о с л и з н е н и е э п и т е л и я. Длительное ослизнение влагалища с образованием многослойного призматического эпителия было вызвано у взрослых кастрированных крыс введением прогестерона, витамина А или прогестерона и эстрогена, у intactных инфантильных крыс - введением прогестерона или тестостерона и у intactных взрослых крыс - введением витамина А. Во всех случаях воздействия муцификация эпителия была связана с интенсивной пролиферацией клеток базального слоя (табл. 2) и гиперплазией эпителиального пласта.

У инфантильных и кастрированных крыс развитие слизистого эпителия оказалось прямым, происходящим без превращения клеточного состава исходного эпителия. Развитие эпителия при

Т а б л и ц а 2

Частота мигров во влажном виде
в разных условиях опыта

Содержание омьон	Исходный эпителий	Мигротический коэффициент в %				
		Длительность эстрогенного воздействия в сутках				
		1	4	7	14	21
Кастрация + эстроген	0,4 ± 0,07	15,1 ± 1,3	21,5 ± 1,6	22,8 ± 1,9	20,9 ± 2,1	16,5 ± 1,8
Кастрация + прогестерон	0,4 ± 0,07	11,6 ± 1,2	19,0 ± 1,8	7,3 ± 0,6		
Кастрация + прогестерон и эстроген	0,4 ± 0,07	8,4 ± 1,0	12,3 ± 1,1	6,9 ± 0,8	7,8 ± 0,8	
Кастрация + эстроген + миг А	0,4 ± 0,07	3,2 ± 0,4	18,1 ± 1,9	17,0 ± 1,4	8,8 ± 1,2	0,8 ± 0,2
Мифентиллен + гнаторгизон	0,9 ± 0,2	1,5 ± 0,3	1,9 ± 0,3	1,3 ± 0,2		
Мифентиллен + тестостерон	0,9 ± 0,2	14,1 ± 0,9	19,8 ± 1,3	20,2 ± 1,3		

воздействию на интактных половозрелых крыс зависело от фазы эстрального цикла и обычно происходило непрямым путем. Если введение витамина А было начато в эструсе, то все слои, лежащие над базальным слоем исходного ороговевающего эпителия, быстро отторгались, и за счет базального слоя образовались новые, слизистые слои. В случае опытов, начатых в диэструсе или проэструсе, поверхностный кубический слой в начале гипертрофировался и интенсивно продуцировал слизь. Лежащие под ним слои, однако, прекращали муцификацию эпителия, становились плоскими и местами проявляли признаки ороговения. Лишь после отторжения этих слоев образовался постоянно ослизненный эпителий.

По морфологическим признакам влагалищный эпителий, подвергшийся индуцированному ослизнению, обнаруживает, в общих чертах, два типа строения. Первый тип представляет собой двухзоновый эпителий, состоящий в нижней части из полигональных клеток, не проявляющих признаков ослизнения, и в верхней части — из кубических или цилиндрических клеток, продуцирующих слизь (рис. 2). Такой тип эпителия встречается при действии прогестерона, тестостерона или витамина А, и в некоторой мере напоминает тот, который имеется у контрольных животных в фазе диэструса (если не учитывать гипопластический вид последнего). Другой тип ослизненного эпителия является трехзоновым, сходным с влагалищным эпителием у беременных крыс (рис. 3). Базальная зона состоит из нескольких слоев полигональных клеток, несколько уплощенных в наивысшем слое. Промежуточная, слизистая зона состоит из 1-3 слоев цилиндрических клеток, наполненных слизью. Поверхностная зона представлена 1-2 слоями базофильных кубических клеток, содержащих немного слизи. Такой характер эпителия обнаруживается при одновременном действии прогестерона и эстрогена.

Все изученные гистохимические реакции усилены во всех случаях воздействия по сравнению с исходным атрофическим эпителием. Больше всего влияет на интенсивность этих реакций совместное действие эстрогена и прогестерона, но общий характер изменений примерно одинаков во всех случаях опытов. Содержание белка в ядрах наивысшее в базальном слое, в направлении поверхностных слоев оно постепенно уменьшается.

В цитоплазме клеток наивысшая концентрация белков обнаруживается в верхних слоях базальной зоны, непосредственно под призматическими слизистыми клетками, а также, в случае трехзонавого эпителия, - в поверхностном слое (рис. 4). Содержание РНК обнаруживает высокий уровень во всех слоях, но больше всего в базальном и наивысшем слоях. Реакция ядер на ДНК равномерная во всех клеточных слоях (рис. 5).

Первым изменением, наблюдаемым в характере распределения активности кислой фосфатазы во влагалищном эпителии под действием муцифицирующих факторов, является увеличение диффузности распределения продуктов реакции, в частности в базальных слоях. Затем обнаруживается общее повышение активности фермента во всем эпителиальном пласте, преимущественно в верхней, ослизненной части эпителия.

И н д у ц и р о в а н н о е о р о г о в е н и е э п и т е л и я. Длительное ороговение влагалищного эпителия кастрированных или инфантильных крыс было вызвано повторными введениями эстрогенов или гидрокортизона.

Кератинизация, вызванная эстрогенами, мало чем отличается от эструсной кератинизации у контрольных животных. Она связана с интенсивной пролиферацией клеток базального слоя (табл. 2) и сильной гиперплазией эпителиального пласта (до 9-14 клеточных слоев). Превращение исходного эпителия в ороговевающий было непрямым. В начале исходные поверхностные клетки гипертрофировались, становились цилиндрическими, интенсивно секретирующими слизь (рис. 6). Под этим слоем образовались слои плоских клеток, в которых обнаруживались признаки кератинизации. Такой эпителий сходен с тем эпителием, который выстилает влагалище у контрольных животных в фазе проэструса. Затем слизистый слой отторгнулся и на поверхности эпителия образовался толстый ороговевающий слой. Гистологическое строение эпителия приобретало типичный характер для ороговевающего эпителия, состоящего из четырех, хорошо выраженных зон: базальной (герминативной - из одного клеточного слоя), шиповатой (из 6-10 слоев), зернистой (из 2-4 слоя) и роговой (рис. 7).

Содержание ядерного белка в ороговевающем эпителии высокое в 1-2 нижних слоях, а в остальных слоях постепенно уменьшается. Количество цитоплазматического белка обнаружи-

вает повышение в направлении поверхностных слоев, особенно при переходе на роговой слой (рис. 8). Реакция на белки выявляется и в кератогиалиновых гранулах. Реакция на кератин появляется в верхней части зернистой зоны, но кератогиалиновые гранулы такой реакции не обнаруживают.

Содержание РНК является высоким в цитоплазме клеток двух нижних слоев, затем оно постепенно уменьшается к поверхности, исчезая на границе ороговевающей зоны (рис. 9). Заметную реакцию на РНК обнаруживают кератогиалиновые гранулы. Реакция ядер на ДНК быстро снижается выше базального слоя и исчезает в зернистой зоне.

Распределение активности кислой фосфатазы в ороговевающем эпителиальном пласте неравномерное. В 2-3 нижних клеточных слоях обнаруживается слабая активность в виде гранулярного распределения продукта реакции. В промежуточных слоях, до зернистой зоны, активность фермента не выявляется. В зернистой зоне реакция появляется снова, в виде интенсивного окрашивания ядер и крупных цитоплазматических гранул. Роговой слой обнаруживает очень сильную диффузную реакцию, в частности в нижней части его.

Характер кератинизации, вызванной введением гидрокортизона, нетипичен по нескольким признакам. Эпителий обнаруживал низкую пролиферативную активность (табл. 2) и являлся относительно тонким (рис. 10а). Разделение эпителиального пласта на зоны слабо выражено. Роговой слой был тонким и рыхлым, в нем обнаруживались остатки клеток и ядер (паракератоз). Содержание белков и РНК в эпителии более низкое, с менее выраженными градиентами распределения, чем при эстрогенной кератинизации. Реакция на кислую фосфатазу слабая с гранулярным распределением во всем эпителии.

При одновременном введении гидрокортизона и прогестерона развивается многослойный плоский эпителий с дегенерацией клеток на поверхности, но без настоящей кератинизации (рис. 10б).

Обсуждение

Во всех изученных случаях как физиологических, так и экспериментально вызванных состояний влагалищного эпителия, ядбазальные неделящиеся клетки обнаруживают детерминацию в одном из двух возможных направлений дифференцировки: ослизнения или ороговения. Эти дифференцировки обратимые на тканевом уровне, а на клеточном уровне — необратимые, конечные. Возможность развития клетки по тому или другому пути однозначно определена уже при выходе ее из базального слоя и, как предполагается, происходит, по-видимому, в момент предшествующего митоза /6/. Тип дифференцировки эпителия не зависит от интенсивности пролиферации; от последней зависит степень гиперплазии эпителия. Интенсивность продукции слизи и кератина зависит от общей метаболической активности клеток, обусловленной характером действующих факторов.

Постараемся определить наиболее важные обстоятельства, обнаруживаемые в процессах альтернативной дифференцировки влагалищного эпителия, которые следует учитывать при объяснении механизмов действия дифференцирующих факторов.

1. Состояние ядер при ослизнении и ороговении клеток принципиально различное. Слизистые клетки обнаруживают постоянную РНК — синтезирующую активность ядер. При ороговении, однако, ядра инактивные уже в момент выхода клеток из базального слоя и в них происходит относительно быстрая редукция количества белка и ДНК /10, 21, 22/. Синтез белка в процессе ороговения зависит от "долгоживущих" РНК-матриц /22/, синтезированных уже в базальном слое, количество которых уменьшается в ходе развития клеток.

2. Все известные муцифицирующие факторы (витамин А, прогестерон, тестостерон, рентгеновское излучение) имеют одно общее свойство — лабилизирующее действие на мембрану лизосом, активируя и освобождая гидролитические ферменты лизосом /23/.

3. Гидрокортизон, вызывающий ороговение эпителия и подавляющий муцифицирующее действие прогестерона и, по крайней мере *in vitro* /24/, витамина А, является сильным стабилизатором лизосомных мембран /23/. Ороговение, вызываемое им,

имеет те же особенности, что обнаружены при авитаминозе А /10/. У природных эстрогенов не обнаружено заметного действия на мембрану лизосом.

4. Во всех случаях ослизнения влагалищного эпителия, в отличие от ороговения, в клетках базального слоя обнаруживалось в значительной мере диффузное распределение продукта реакции на кислую фосфатазу, один из ферментов лизосом.

5. Главным физиологическим фактором, определяющим возможные состояния влагалищного эпителия, является витамин А. Недостаток этого витамина вызывает ороговение /9-II/, а избыток его — ослизнение.

Половые гормоны способны оказывать дифференцирующее действие на влагалищный эпителий только на физиологическом (нормальном) уровне содержания витамина А в организме. В последнем случае, при отсутствии функций яичников и экзогенных воздействий, эпителий является дифференцированным по слизистому типу, хотя и гипопластическим и атрофическим. По многим данным, определенный уровень витамина А является необходимым для поддержания слизистого состояния различных эпителиев /9, 25, 26/.

6. Действие эстрогенов на влагалищный эпителий не является прямым и специфическим в отношении ороговения. Во-первых, эстрогены стимулируют и слизиобразование в компетентных клетках. Во-вторых, кератинизирующее действие эстрогена проявляется лишь при отсутствии муцифицирующих факторов, хотя общестимулирующее действие его на клетки не зависит от этого условия. В-третьих, показано, что ороговение влагалищного эпителия *in vitro* зависит от характера культивации, а не от наличия или отсутствия эстрогена /27/. В-четвертых, имеются данные, что ороговевающее действие эстрогена на влагалищный эпителий реализуется через действие на соединительнотканную строму и базальную мембрану /28/. Обнаружено, что в строме и базальной мембране происходят значительные структурные и гистохимические изменения как в ходе эстрального цикла, так и при введении эстрогенов /17, 28, 29/.

На основе приведенных заключений нам кажется, что вряд ли в клетках эпителия имеет место специфическая индукция-репрессия генных локусов, ответственных за альтернативную

дифференцировку клеток. Мы предлагаем гипотезу, которая основывается на допущениях об общей активации-инактивации ядер базальных клеток и детерминации реализуемых возможностей дифференцировки на посттранскрипционном уровне.

Допустим, что постмитотическая активация ядер в клетках базального слоя зависит от определенного уровня активности некоторых лизосомных ферментов. При лабильзованном состоянии лизосом (в присутствии достаточного количества витамина А или других лабильзирующих факторов и отсутствии сильно стабилизирующих факторов) эти ферменты попадают в ядра и вызывают общую активацию хроматина (конечно, в пределах тканеспецифических ограничений, механизмы которых не известны). При стабилизированном состоянии лизосом (из-за недостатка витамина А или наличия стабилизирующих факторов, например гидрокортизона) часть из дочерних ядер остается в инактивном состоянии.

Клетки с активными ядрами способны к синтезу как кератиноспецифическую, так и слизеспецифическую мРНК. Слизеспецифическая мРНК (кодирующая ферменты для образования мукополисахаридов) является "короткоживущей" и быстрообновляемой /30/. Кератиноспецифическая мРНК является потенциально "долгоживущей" (при низкой активности лизосомных ферментов) и для синтеза кератиновых белков она должна образовать с рибосомами сложные стойкие комплексы /31/. При отсутствии стимулирующих факторов (половых гормонов, в частности эстрогенов) все эти типы мРНК, как и рибосомные РНК, синтезируются с низкой интенсивностью. Синтез белков на основе этих матриц происходит в основном в клетках надбазальных слоев (может существовать подавление со стороны стромы или при определенном уровне накопления белков клетки теряют способность к делению и должны покидать базальный слой). При активированном состоянии лизосом (и ядер) функционируют главным образом слизеспецифические матрицы, так как кератиновые матрицы в этом случае распадаются слишком быстро для того, чтобы могли образоваться стойкие синтетические комплексы с рибосомами. Слизеобразование зависит и от прямого присутствия витамина А, так как последний стимулирует синтез мукополисахаридов на уровне соответствующих ферментов /32/.

В клетках с инактивными ядрами скоро распадаются "короткоживущие" слизеспецифические матрицы и возможен только синтез кератиновых белков за счет "долгоживущих" матриц, синтезированных заранее. Эти клетки, при выходе из базального слоя, подвергаются ороговению.

В физиологических условиях нормальный уровень витамина А, вызывающий достаточную лабильность лизосом для развития слизистого состояния эпителия, обеспечивается диффузией через базальную мембрану из стромы. Кератинизирующее действие эстрогена состоит в создании недостатка витамина А в эпителии, или за счет образования базального диффузионного барьера, или за счет более прочного связывания витамина в строме.

Автор понимает спекулятивность основных положений гипотезы. Но, по существу, эта гипотеза очень проста и может быть легко подвергнута экспериментальной проверке.

Заключение

Влагалищный эпителий инфантильных и кастрированных крыс является гипопластическим и атрофическим, но дифференцированным по слизистому типу. При введении витамина А, прогестерона, тестостерона или прогестерона с эстрогеном обнаруживается повышение пролиферации и развитие гиперпластического, ослизненного цилиндрического эпителия. При этом наблюдается усиление диффузной активности лизосомного фермента кислой фосфатазы, прежде всего в базальном слое, и равномерное содержание ДНК и РНК во всех клеточных слоях. Эстроген вызывает ороговение эпителия, связанное с интенсивной пролиферацией и гиперплазией, а гидрокортизон — ороговение со слабовыраженной пролиферацией и гиперплазией. Гидрокортизон, кроме того, подавляет муцифицирующее действие прогестерона. В ороговевающем эпителии обнаруживается слабая гранулярная активность кислой фосфатазы в базальных слоях и постепенное понижение содержания ДНК и РНК в надбазальных слоях.

Предлагается гипотеза по механизмам альтернативной дифференцировки влагалищного эпителия, по которой направление дифференцировки клеток определяется на посттранскрипционном уровне. Гипотеза основывается на допущениях о том, что общая

активация постмитотических ядер, продолжительность существования и синтетическая активность различных РНК-матриц зависят от активности лизосомных ферментов. Эта гипотеза объясняет зависимость направления дифференцировки эпителия от содержания витамина А и роль соединительнотканной стромы в кератинизирующем действии эстрогена.

Л и т е р а т у р а

1. Mercer E.H. Keratin and keratinization. Oxford, 1961.
2. Stegner H.-E., Iwata M. Elektronenmikroskopische Untersuchungen am Scheidenepithel der Ratte während des östrischen Zyklus. Z. mikrosk.-anat. Forsch., 1967, 76, 491-508.
3. Попова Е.А. Изменчивость влагалищного и маточного эпителия крыс в нормальных условиях и под влиянием тестостерона. Арх. патол., 1963, 25, 8, 48-57.
4. Вольфсон Н.И. Некоторые особенности специальной деятельности, гиперплазии и аплазии нормального цервикального и маточного эпителия у мышей. Арх. анат., 1966, 51, 9, 82-88.
5. Вольфсон Н.И. О гистогенезе рака шейки матки в свете современных сравнительногистологических и экспериментальных данных. Арх. патол., 1967, 29, 2, 3-13.
6. Husbands M.E., Walker B.E. Differentiation of vaginal epithelium in mice given estrogen and thymidine- H^3 . Anat. Rec., 1963, 147, 187-198.
7. Schwartz N.B. Acute effects of ovariectomy on pituitary LH, uterine weight, and vaginal cornification. Am.J. Physiol., 1964, 207, 1251-1259.
8. Viikmaa M. Epidermaalsete epiteelide diferentseerumine. Uliõpilaste zooloogia-alaste tööde kogumik II. Tartu, 1968, 34-42.
9. Wolbach S.B., Howe P.H. Tissue changes following deprivation of fat-soluble A vitamin. J.exp. Med., 1925, 42, 753-778.

10. Bern H.A., Alfert M., Blair S.M. Cytochemical studies of keratin formation and of epithelial metaplasia in the rodent vagina and prostata. J. Histochem. Cytochem., 1957, 5, 105-119.
11. Попова Е.А. Изменчивость маточного и влагалищного эпителия при авитаминозе А. Арх. патол., 1958, 20, 9, 59-68.
12. Kahn H.H., Bern H.A. Antifolliculoid activity of vitamin A. Science, 1950, 111, 516-517.
13. Cherry O.P. The modification by irradiation of the oestrogen effect on the cervico-vaginal epithelium of castrated rats. Brit. J. Radiol., 1957, 30, 239-246.
14. Glucksman A. The effect of radiation on the production of mucin in salivary glands and the female genital tract of rodents. Ann. New York Acad. Sci., 1963, 106, Art. 2, 631-637.
15. Kamell S.A., Atkinson W.B. Effects of ovarian hormones on certain cytoplasmic reactions in the vaginal epithelium of the mouse. Proc. Soc. exp. Biol., 1948, 68, 537-540.
16. Kahn R.H. Effect of locally applied vitamin A and estrogen on the rat vagina. Am. J. Anat., 1954, 95, 309-312.
17. Green J.A. Effects of steroid hormones on the epithelium, tunica propria and their junction in the mouse vagina. Anat. Rec., 1959, 135, 247-259.
18. Шубич М.Г. Вариант гистохимической реакции Даниелли на белок. Арх. патол., 1963, 25, 12, 68-70.
19. Шубич М.Г. Методика гистохимического обнаружения кератина с помощью кислого раствора основного коричневого. Арх. анат., 1963, 44, 6, II4-II6.
20. Holt, S.J. Factors governing the validity of staining methods for enzymes, and their bearing upon the Gomori acid phosphatase technique. Exp. Cell Rec., 1959, suppl. 7, 1-27.

21. Pelc S.R. The participation of the cell nucleus and its DNA in the formation of keratin. *Exp. Cell Res.*, 1959, suppl. 6, 97-104.
22. Дэвидсон Э. Действие генов в раннем развитии. М., 1972.
23. Allison A. The role of lysosomes in the action of drugs and hormone. *Adv. Chemotherapy*, 1968, 2, 253-302.
24. Fell H.B. The influence of hydrocortisone on the metaplastic action of vitamin A on the epidermis of embryonic chicken skin in organ culture. *J. Embryol. exp. Morphol.*, 1962, P. 2, 389-409.
25. Aydelotte M.B. Vitamin A deficiency in chickens. *Brit. J. Nutr.*, 1963, 17, 205-210.
26. Lawrence D.L., Bern H.A. Vitamin A and mucous metaplasia. *Ann. New York Acad. Sci.*, 1963, 106, Art. 2, 646-653.
27. Dux K., Kozirowska J. Czy nabyłonek pochwy w hodowli in vitro reaguje na estrogeny? *Endokr. Polska*, 1958, 2, 183-186.
28. Bartoszewicz W., Dux K. Effect of estrogens on the basement membrane of normal and neoplastic vaginal epithelium in mice. *Anat. Rec.*, 1961, 140, 167-181.
29. Bartoszewicz W., Zych F. O wpływie estrogenów na mukopolisacharydy i aktywność fosfataz zasadowych w pochwie i macicy myszy. *Endokr. Polska*, 1960, 11, 91-104.
30. Davidson E.H., Allfrey V.G., Mirsky A.E. Gene expression in differentiated cells. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.*, 1963, 49, 53-55.
31. Priestley G.C., Speakman P.T. Intra-cellular site of epidermal keratin synthesis. *Nature*, 1966, 209, 1336-1337.
32. Wolf G., Bergan J.G., Sundaresan P.R. Vitamin A and mucopolysaccharide biosynthesis by cell-free particle suspensions. *Biochim. Biophys. Acta*, 1963, 69, 524-532.

Characteristics and Factors of Alternative Differentiation of Vaginal Epithelium

M. Viikmaa

S u m m a r y

Some morphological and histochemical changes characterizing the alternative differentiations of vaginal epithelium were studied in vivo under the influence of different substances. The sample consisted of 166 female rats, among them infantile, adult castrated and intact ones.

The vaginal epithelium of infantile and castrated rats was hypoplastic and atrophic, but revealed a clear-cut mucous type of differentiation.

By subcutaneous administration of high doses of vitamin A, progesterone and testosterone separately or progesterone and estrogen together, an intense mucification of vaginal epithelium, accompanied by marked proliferation and hyperplasia, was induced. An increase of diffuse activity of acid phosphatase was found in the basal layers. Constant DNA and RNA contents were noted in all cell layers.

Under the influence of either estrogen or hydrocortisone keratinization of the epithelium was induced. In the case of estrogen a high activity of proliferation and hyperplasia was observed; in the case of hydrocortisone a low activity was noticed. Hydrocortisone, in addition, prevented the mucous action of progesterone. In the keratinized epithelium a very low activity of acid phosphatase of granular type was noted in the basal layers. A gradual decrease of DNA and RNA contents, but an increase of protein content took place in the upper layers.

A hypothesis on the mechanisms of the alternative differentiations of vaginal epithelium is presented. According to it the direction of cellular differentiation is determined on the post-transcriptional level. The hypothesis is based on the assertions that a general (tissue-specific) activation of post-mitotic nuclei, the life-time and syn-

thetic activity of different mRNA depend upon the activity of lysosomal enzymes (which itself depends on the presence of lysosome labilizers or stabilizers). The hypothesis explains the dependence of differentiation of vaginal epithelium upon vitamin A, and the role of connective tissue stroma and basement membrane in the keratinizing action of estrogen.

ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ДЕЙСТВИЯ 2,4-Д НА КАЛЛУСНЫЕ ТКАНИ *НАРЛОРАППУС GRACILIS*

Х. Каллак, Ю. Каареп

2,4-дихлорфеноксиуксусная кислота (2,4-Д) является широко используемым гербицидом, а также эффективным синтетическим ауксином, в зависимости от применяемой дозы, от факторов внешней среды и от специфических свойств возделываемых растений. Известно, что разные виды и сорта, а также разные ткани одного растения по-разному реагируют на 2,4-Д /I-IO/.

Большинство исследований воздействия 2,4-Д проведено на интактных растениях и ограничивается характеристикой ее физиологических и морфогенетических эффектов. Но в последние годы все большего внимания заслуживает возможная мутагенная роль пестицидов, в том числе и 2,4-Д. Известные нам исследования цитогенетического эффекта 2,4-Д и подобных ей веществ показывают, что под их влиянием индуцируются хромосомные перестройки и появляются разные отклонения от нормального течения митоза (К-митозы, псевдоамитозы, многополюсные митозы, ана- и телофазные мосты, фрагменты и др.), приводящие к гетероплоидии /II-29/.

Целью наших исследований стало изучение цитогенетического эффекта ауксиновых и гербицидных доз 2,4-Д в условиях культуры ткани, позволяющих изучать реакцию клеток на биологически активные вещества вне регулирующих систем целостного организма. К тому же, каллусные клетки, являющиеся объектом наших исследований, нуждаются в экзогенных ауксинах, следовательно, принимают 2,4-Д как гормональное вещество. Многие считают, что гербицидное действие 2,4-Д обусловлено именно проявлением ее гормональной активности /30,31/.

Материал и методика

Объектом исследования служили три штамма каллуса гаплопаппуса *Нарлорарпус gracilis* (Nutt.) Gray, выделенные от стеблевых сегментов и культивированные 5,5-9,5 лет на агаровой питательной среде по Мурасиге и Скугу /32/ со следующими

добавками (мг/л): аденин (1,0), 2,4-Д (1,0), гидролизат казеина (1000), витамин В₁ (0,4).

Изученные нами каллусные штаммы (А, В и С) различаются по интенсивности роста и пигментации ткани, а также по степени плоидности ($2n = 4$) и частоте хромосомных aberrаций своих клеток:

1) штамм А - хорошо растущая гомогенная компактная ткань бледного (почти белого) цвета с модальным числом хромосом 12-20 и со средней частотой (%) aberrативных ана- и телофаз ~ 44 ;

2) штамм В - хорошо растущая гомогенная мягкая ткань светло-желтого цвета с модальным числом хромосом 8-16 и со средней частотой (%) aberrативных ана- и телофаз ~ 19 ;

3) штамм С - медленно растущая относительно хрупкая желтая ткань с модальным числом хромосом 8-16 и со средней частотой (%) aberrативных ана- и телофаз ~ 29 .

Для выяснения действия 2,4-Д каллусные ткани штаммов А, В и С выращивали на питательной среде с разным содержанием (1, 5, 10, 20 и 50 мг/л) 2,4-Д.

Цитогенетические исследования проводили на давленных препаратах, приготовленных стандартным методом ацеторсеина. В качестве показателей воздействия 2,4-Д использовались митотический индекс (процент митотических клеток от 5000 просмотренных клеток), степень плоидности (результат анализа 100 метафаз) и частота хромосомных aberrаций (результат анализа 100 ана- и телофаз).

Результаты исследований проработаны статистически, вычислением критерия χ^2 и по методу $\varphi / 133/$.

Результаты исследований

Все три штамма каллуса гаплопаппуса реагировали на увеличение дозы 2,4-Д по н и ж е н и ю т е м п а р о с т а и п и г м е н т а ц и и ткани. При этом проявились заметные различия в резистентности отдельных штаммов в отношении 2,4-Д. В штамме А ингибирующее действие 2,4-Д стало заметным только при концентрации 10 мг/л и даже при концентрации 50 мг/л можно было найти еще некоторые митозы в клетках этого же штамма. Зато у штамма В добавление в среду 2,4-Д

уже в количестве 5 мг/л вызывало замедление роста, а доза 10 мг/л оказалась явно гербицидной, в результате чего каллусная ткань превратилась к концу субкультуры в липкую коричневатую массу и погибла. Повторная пересадка штамма В на среду с содержанием 5 мг/л 2,4-Д вызвала пигментацию и постепенное прекращение роста ткани. Совершенно невозможной оказалась повторная пересадка ткани штамма В на среду с содержанием 2,4-Д в количестве 10 мг/л или больше. Штамм С отличился самой высокой резистентностью в отношении увеличения дозы 2,4-Д в среде питания. Ткани этого штамма нормально росли на среде с содержанием 5 или 10 мг/л 2,4-Д, ингибирующее действие проявилось только при концентрации 20 мг/л, но и эта доза не вызвала еще прекращения роста и нам удалось провести пять следующих друг за другом пересадок на среду с 20 мг/л 2,4-Д.

Соответствующие митотические индексы, отражающие ингибирующее действие повышенных доз 2,4-Д, вычислены нами для штамма А. В таблице I приведены данные о динамике митотической активности каллусных клеток штамма А под воздействием разных концентраций 2,4-Д в среде питания. Оказывается, что ингибирующее действие 2,4-Д неодинаково проявляется в изученных нами пассажах данного штамма. Если в субкультуре 13-го пассажа, отличающегося более высоким митотическим индексом у контрольного варианта, 2,4-Д уже в дозе 5 мг/л понижает митотический индекс соответствующего подопытного варианта вдвое, то в субкультуре 14-го пассажа этого штамма то же самое происходит только при концентрации 2,4-Д 10 мг/л, а подопытный вариант с 5 мг/л 2,4-Д в среде питания по своему митотическому индексу даже несколько превышает контрольный вариант.

Для изучения действия 2,4-Д на степень ploидности каллусных клеток гаплопаппуса мы определили хромосомные наборы в некоторых пассажах подопытных штаммов. Все три изученных штамма были гетерополиплоидные, т.е. состояли из клеток с разной степенью полиплоидии, причем диплоидные клетки ($2n = 4$) практически отсутствовали. Модальным числом хромосом (60-80% метафаз) для штамма А было 12-20 ($6n - 10n$), для штаммов В и С - 8-16 ($4n - 8n$). Определения проводились в 5-ые, 10-ые, 15-ые и 20-ые сутки соответ-

Т а б л и ц а I

Воздействие 2,4-Д на многоочковый индекс (МИ)
кормовой культуры гапленепуса (птом А)

Возраст культуры (в пасеках)	Дозы 2,4-Д (мг/л)	Возраст суккултуры (сутки)			Средний МИ суккултуры
		5	10	15	
Многоочковый индекс					
I3	I	3,8 ± 0,39	-	4,3 ± 0,41	4,1
	5	2,0 ± 0,29	-	2,8 ± 0,34	2,4
	10	1,2 ± 0,22	-	1,2 ± 0,22	1,2
	20	0,6 ± 0,16	-	-	-
I4	I	2,9 ± 0,34	2,6 ± 0,33	3,2 ± 0,36	2,9
	5	3,4 ± 0,37	2,5 ± 0,32	3,4 ± 0,37	3,1
	10	1,7 ± 0,26	1,3 ± 0,23	1,6 ± 0,25	1,5
	20	0,7 ± 0,17	0,7 ± 0,17	1,2 ± 0,22	0,9

ствующей субкультуры.

Результаты исследования однократного воздействия 2,4-Д на хромосомные наборы каллусных клеток гаплопаппуса представлены в таблицах 2-4.

Из таблицы 2 следует, что в результате однократного увеличения 2,4-Д в среде питания штамма А статистически достоверно снижается степень плоидности клеток этого штамма: увеличивается количество митотических клеток с хромосомным набором 4-II и уменьшается количество митотических клеток с хромосомным набором 16-20. По данным таблицы 2 можно заключить еще следующее: цитогенетический эффект повышенных доз 2,4-Д проявляется в углублении характерной для культуры тенденции. В данном случае для изученной субкультуры штамма А характерно понижение степени плоидности в течение пассажа, под воздействием повышенных доз 2,4-Д эта тенденция проявляется еще сильнее.

Иные результаты получены нами от исследования воздействия 2,4-Д на степень плоидности каллусных штаммов В и С. Однократное добавление в среду питания повышенных доз 2,4-Д не вызвало определенных изменений в числе хромосом митотических клеток у этих штаммов. При всех изученных концентрациях (1,5 и 10 мг/л) 2,4-Д сохранилась характерная для штаммов гетерополиплоидия с модалным числом хромосом 8 - 16 (табл. 3, 4). Наблюдаемые различия в соотношении разноплоидных клеток являются статистически недостоверными или носят случайный характер. Статистически достоверные различия обнаруживаются, например, в соотношении разноплоидных клеток штамма В, выращенного на среде питания с разным содержанием 2,4-Д. Но в этих различиях трудно заметить определенную тенденцию. Так, добавление в среду питания 5 мг/л 2,4-Д не вызвало существенных различий в соотношении разноплоидных клеток в 5-ые, 10-ые и 20-ые сутки субкультуры (кроме некоторого уменьшения числа клеток с хромосомным набором 20 и больше), но в 15-ые сутки обнаружилось достоверные различия, по сравнению с контрольным вариантом (1 мг/л 2,4-Д): увеличилось количество клеток с хромосомным набором 8-II и соответственно уменьшилось количество клеток с хромосомным набором 16 и больше. На среде с содержанием 10 мг/л 2,4-Д также, по сравнению с контрольным вариантом (1 мг/л 2,4-Д), увели-

Т а б л и ц а 2

Однократное действие 2,4-Д на число хромосом в штатке А.
Представлены проценты клеток /метафаз/ о соответствующим числом хромосом

Число хромосом	В о з р а с т с у б к у л ь т у р н (о у т к и)									
	5					10				
	Доза 2,4-Д (мг/л)		р		р	Доза 2,4-Д (мг/л)		р		р
	I	5	I0	I		I	5	I	5	
4-II	2	5	12	<0,01	7	14	>0,05	31	47	48 <0,05
12-15	15	27	32	<0,05	43	41	>0,05	33	42	32 >0,05
16-20	60	54	40	<0,05	42	14	<0,01	26	6	12 <0,01
> 20	23	14	16	>0,05	8	31	<0,05	10	5	8 >0,05

Т а б л и ц а 3

Однократное действие 2,4-Д на число хромосом в штамме В.
Представлены проценты клеток /метафаз/ о соотношении числом хромосом

Число хромосом	В о з р а с т с у б к у л ь т у р ы (с у т к и)														
	5					10					15				
	Доза 2,4-Д (мг/л)					Доза 2,4-Д (мг/л)					Доза 2,4-Д (мг/л)				
	I		5		10		I		5		I		5		p
8-II	3I	32	44	>0,05	32	23	50	<0,01	44	61	<0,05	43	49	>0,05	
12-15	5I	58	39	<0,05	49	58	37	<0,01	21	33	>0,05	37	37	-	
16-20	7	7	8	>0,05	7	13	6	>0,05	12	4	<0,05	4	8	>0,05	
>20	11	3	9	>0,05	12	6	7	>0,05	23	2	<0,01	16	9	>0,05	

Т а б л и ц а 4

Однократное действие 2,4-Д на число хромосом в ядре С.
Представлены проценты клеток /метафаз/ с отсутствующим числом хромосом

Число хромосом	В о з р а с т о у б к у л ь т у р ы (с у т к и)																			
	5					10					15					20				
	Доза 2,4-Д (мг/л)					Доза 2,4-Д (мг/л)					Доза 2,4-Д (мг/л)					Доза 2,4-Д (мг/л)				
	р					р					р					р				
	1	5	10			1	5	10			1	5	10			1	5	10		
4-II	45	40	34	>0,05	43	42	53	>0,05	41	46	40	>0,05	16	41	32	<0,01				
I2-I5	41	42	53	>0,05	44	41	40	>0,05	51	47	42	>0,05	54	37	49	<0,05				
I6-20	14	17	12	>0,05	9	14	7	>0,05	7	6	8	>0,05	24	19	12	>0,05				
>20	0	1	1	>0,05	2	3	0	>0,05	1	1	0	>0,05	6	3	7	>0,05				

чилось число клеток с хромосомным набором 8-II, но существенно не изменилось количество клеток с хромосомным набором 16 и больше. Зато уменьшилась доля клеток с 12-15 хромосомами. В таблице отсутствуют данные о воздействии 10 мг/л 2,4-Д в 15-не и 20-не сутки субкультуры, поскольку каллусная ткань этого штамма больше 10-12 суток на среде питания с такой дозой гербицида не росла.

У штамма С некоторые достоверные различия в соотношении разноплоидных клеток контрольного (1 мг/л 2,4-Д) и подопытных (5 и 10 мг/л 2,4-Д) вариантов проявляются только в конце субкультуры, в 20-не сутки. Но за этими вариациями трудно увидеть определенную тенденцию. Если в подопытном варианте с 5 мг/л 2,4-Д, по сравнению с контрольным вариантом, увеличилось количество клеток с 4-II хромосомами и уменьшилось количество клеток с 12-15 хромосомами, то в подопытном варианте с 10 мг/л 2,4-Д соответственно увеличилось количество клеток с 4-II хромосомами, а уменьшилось количество клеток с 16-20 хромосомами. К тому же, соотношение клеток с 4-II и 12-15 хромосомами у подопытного варианта с 10 мг/л 2,4-Д более близко к соответствующему соотношению у контрольного варианта, чем у подопытного варианта с 5 мг/л 2,4-Д.

Как уже отмечено выше, штамм В каллуса гаплопаппуса оказался настолько чувствительным в отношении 2,4-Д, что на среде с повышенной дозой гербицида удалась только одна пересадка на среду с содержанием 5 мг/л 2,4-Д. Повторное действие 2,4-Д не вызвало существенных изменений в хромосомных наборах штамма В (табл. 5). Все наблюдаемые различия статистически недостоверны ($p > 0,05$).

Каллусную культуру штамма С удалось вырастить на среде с повышенным содержанием 2,4-Д (до 20 мг/л) в течение четырех следующих друг за другом пассажах. В таблице 6 представлены результаты исследования четвертого подопытного пассажа этого штамма. На основе полученных данных можно заключить, что при продолжительном культивировании каллусной ткани на среде питания с содержанием 2,4-Д в количестве 20 мг/л достоверно увеличивается число митотических клеток с хромосомным набором 16-20 и больше, и соответственно уменьшается число митотических клеток с хромосомным набором 4-II. Другими словами, проявляется тенденция к полиплоидизации.

Т а б л и ц а 5

Повторное действие 2,4-Д на число хромосом в штамме В.
Представлены проценты клеток /метафаз/ с соответствующим числом хромосом

Число хромосом	Возраст субкультуры /сутки/					
	5		10		15	
	Доза 2,4-Д /мг/л/					
	I	5	I	5	I	5
4-II	32	32	43	34	15	25
12-15	51	57	42	55	62	55
16-20	8	7	9	6	16	10
> 20	9	5	7	2	7	10

Кроме степени плоидности, нами изучена еще частота хромосомных aberrаций, проявляющихся в ана- и телофазах в виде фрагментов и мостов, и их зависимость от концентрации 2,4-Д в среде питания подопытных штаммов каллуса гаплопаппуса. Результаты исследования представлены в таблице 7. Оказывается, что однократное повышение в среде питания содержания 2,4-Д до 10 мг/л не вызывает достоверных изменений в частоте aberrативных ана- и телофаз соответствующих субкультур штаммов В и С. Зато в частотах aberrаций различных вариантов штамма А обнаруживаются некоторые достоверные различия, хотя без определенной тенденции. Если в 14-ом пассаже штамма А с увеличением дозы 2,4-Д процент aberrаций не изменяется, то в 15-ом пассаже количество aberrаций под воздействием тех же самых доз 2,4-Д увеличивается.

Данные таблицы 7 также показывают, что даже повторное выращивание двух следующих друг за другом пассажей каллусного штамма В на среде питания с содержанием 5 мг/л 2,4-Д не вызывает никаких достоверных изменений в частоте aberrативных ана- и телофаз у этого штамма. Но при продолжительном культивировании штамма С на среде с повышенной дозой (20 мг/л) гербицида обнаруживаются достоверные различия ($p < 0,05$)

Т а б л и ц а 6

Повторное действии 2,4-Д на число хромосом в штатке С.
 Представлены проценты /мутафиз/ о соответствующим числом хромосом

Число хромосом	В о з в р а щ е н и е с у б к у л ь т у р ы (с у т к и)														
	5					10					15				
	Доза 2,4-Д (мг/л)					Доза 2,4-Д (мг/л)					Доза 2,4-Д (мг/л)				
	р					р					р				
	1	5	20			1	5	20			1	5	20		
4-11	46	46	8	<0,01	44	59	22	<0,01	40	43	-	>0,05	51	75	- <0,01
12-15	44	43	33	>0,05	42	32	35	>0,05	55	51	-	>0,05	42	22	- <0,01
16-20	10	7	41	<0,01	12	6	27	<0,01	5	6	-	>0,05	7	3	- >0,05
>20	0	4	18	<0,01	2	3	16	<0,01	0	0	-	0	0	0	-

Т а б л и ц а 7

Воздействие 2,4-Д на частоту aberrаций
в каллусе гаплопаппуса

Штамм, № пассажа	Способ дейст- вия	Доза 2,4-Д (мг/л)	Возраст субкультуры (сутки)			
			5	10	15	20
			% aberrативных ана- и телофаз			
A ^{I4}	одно- кратное	I	59	60	43	-
		5	49	47	42	-
		10	51	56	51	-
		20	44	56	42	-
		50	60	52	-	-
A ^{I5}	одно- кратное	I	30	32	24	-
		5	39	44	36	-
		10	45	-	48	-
B ⁵²	одно- кратное	I	18	18	20	20
		5	22	23	14	22
		10	22	20	-	-
B ⁵⁶	повтор- ное	I	25	25	22	-
		5	26	30	28	-
C ⁴⁹	повтор- ное	I	25	23	32	28
		5	32	29	26	35
		20	38	39	-	-
C ⁵³	одно- кратное	I	29	30	31	34
		5	31	28	30	35
		10	33	32	34	34

в частоте aberrаций у подопытного и у контрольного вариан-
тов. А именно, в результате четырехкратного перепассирования
каллусной культуры штамма С на среду с 20 мг/л 2,4-Д увели-
чивается количество хромосомных aberrаций, проявляющихся в
виде фрагментов и мостов в ана- и телофазах митотических
клеток этого штамма.

Обсуждение

Проведенные нами исследования о воздействии 2,4-Д на каллусные культуры гаглопаппуса показывают, что разные штаммы реагируют по-разному на повышение дозы 2,4-Д в среде питания.

Прежде всего это проявляется в д и ф ф е р е н ц и а л ь н о й р е з и с т е н т н о с т и изученных штаммов в отношении гербицидного действия 2,4-Д. Поскольку подопытные каллусные ткани изолированы от двудольного растения, а 2,4-Д является гербицидом именно для двудольных растений, то можно было ожидать одного: снижения темпа роста до полного его прекращения, повышая соответственно дозы 2,4-Д в среде питания. Кроме этого обнаружились заметные различия в степени резистентности отдельных штаммов в отношении ингибирующего действия 2,4-Д. Если ткани штамма А в какой-то мере, хотя с пониженной митотической активностью, росли еще на среде с 20 мг/л 2,4-Д (т.е. с двадцатикратным содержанием 2,4-Д, по сравнению с контрольным вариантом), то в штамме В уже доза 5 мг/л заметно снизила темп роста каллусной ткани, доза 10 мг/л оказалась явно гербицидной, а при дозе 20 мг/л рост ткани полностью прекратился. Самыми резистентными оказались ткани штамма С, длительно (в течение четырех следующих друг за другом пассажей) культивированные на среде с 5 и 20 мг/л 2,4-Д.

Нас интересовал вопрос, чем обуславливается настолько разная резистентность изученных каллусных штаммов, имеющих общее происхождение (т.е. изолированных от стеблевых сегментов растений гаглопаппуса) и различающихся друг от друга в течение продолжительного культивирования *in vitro*. В связи исследованиями, проведенными нами, заслуживают внимания следующие аспекты: 1) резистентность к 2,4-Д и темп роста каллусных тканей, 2) резистентность к 2,4-Д и особенности хромосомных наборов (степень плоидности и частота хромосомных aberrаций) в изученных каллусных штаммах.

Нами исследования подтверждают /30,31/ точку зрения некоторых авторов о коррелятивной связи резистентности к 2,4-Д с темпом роста соответствующих тканей (или организмов). Относительно хорошо растущий каллус штамма В более

чувствителен в отношении гербицидного действия 2,4-Д, чем каллус медленно растущего штамма С. К тому же субкультуры разных пассажей одного и того же штамма (в данном случае штамма А) показывают разную резистентность к гербициду в зависимости от интенсивности роста соответствующих субкультур. Корреляцию между интенсивностью ростовых процессов и резистентностью к 2,4-Д нетрудно понять, принимая во внимание, что 2,4-Д является не только гербицидом, но и синтетическим ауксином и воспринимается растительной клеткой как гормональное вещество. Другими словами, ингибирующее действие 2,4-Д связывается с проявлением её гормональной активности и в этих процессах мы видим только разные стороны одного и того же явления.

Но приходится констатировать, что одним только темпом роста далеко не объясняется дифференциальная резистентность тканей и организмов в отношении 2,4-Д. Само явление темпа роста зависит от многих внутренних и внешних, от закономерных и случайных факторов, требующих еще изучения, особенно в условиях культуры, столь отличающихся от условий роста интактного организма. Против однозначной связи между темпом роста и резистентностью растительной ткани к 2,4-Д свидетельствуют, например, наши данные, полученные при сравнительном исследовании штаммов А и В. Оба эти штамма отличались хорошим для культуры ткани темпом роста и имели в исследованных нами пассажах приблизительно одинаковые митотические индексы, но заметно различались по резистентности к 2,4-Д.

Сопоставление резистентности изученных штаммов каллуса гаплопаппуса со степенью плоидности их клеток не показывает никакой корреляции: штаммы В и С, близкие по хромосомному набору своих клеток (модальное число хромосом 8-16), резко различаются по своей резистентности к 2,4-Д. Зато более близкими по своей резистентности оказываются штаммы А и С, различающиеся по своему хромосомному набору (модальное число хромосом у штамма А 16-20).

Сравнивание резистентности исследованных каллусных штаммов с характерной для них частотой хромосомных aberrаций (в частности, проявляющихся в ана- и телофазах) позволяет предполагать, что между этими показа-

телями имеется корреляция: штаммы А и С, имеющие более высокую частоту aberrаций (~ 44 и 29%), более резистентны в отношении 2,4-Д, чем штамм В, имеющий более низкую частоту aberrаций ($\sim 19\%$).

Следовательно, цитогенетическое изучение действия 2,4-Д на каллусные штаммы гаплопаппуса показывает, что дифференциальная резистентность этих штаммов связывается с частотой хромосомных aberrаций, проявляющихся в ана- и телофазе митотических клеток, но не связывается со степенью ploидности митотических клеток.

На основе наших исследований можно сделать и некоторые предположения о м у т а г е н н о м э ф ф е к т е 2,4-Д в условиях культуры растительной ткани. Оказывается, что мутагенный эффект 2,4-Д на хромосомном уровне (т.е. на степени ploидности и частоте aberrаций) зависит прежде всего от внутренних, специфических для соответствующих клеток, свойств и тенденций и проявляется дифференциально даже в каллусных штаммах общего происхождения. Одна и та же доза 2,4-Д может привести к изменениям в числе хромосом или в частоте aberrаций каллусных клеток, но может и не вызывать изменений в названных показателях. Так, повышение дозы 2,4-Д в среде питания вызвало достоверное понижение степени ploидности в митотических клетках штамма А, но не привело к соответствующим изменениям в штаммах В и С. Сравнение хромосомных наборов у контрольных вариантов изученных штаммов показывает, что если для штаммов В и С характерно относительное постоянство модалного числа хромосом как в течение субкультуры, так и в разных пассажах, то в штамме А происходит понижение степени ploидности в течение субкультуры изученного пассажа. Следовательно, цитогенетический эффект повышенных доз 2,4-Д проявляется в углублении характерной для каллусной культуры тенденции: если для культуры характерно изменение степени ploидности, то под воздействием 2,4-Д эта тенденция еще более усиливается, а если для культуры характерно постоянство степени ploидности, то и 2,4-Д не вызывает достоверных изменений в хромосомных наборах этой культуры.

Что касается эффекта действия 2,4-Д на частоту хромосомных aberrаций, то в результате однократного воздействия повышенных доз 2,4-Д или не происходит достоверных изменений в

частоте aberrаций каллусных клеток (штаммы В и С), или эти изменения не имеют определенной тенденции (штамм А).

Особого внимания заслуживают результаты продолжительного выращивания каллусных тканей гаплопаннуса на среде с повышенным содержанием 2,4-Д. В этих исследованиях проявляется кумулятивный характер действия 2,4-Д. Так, ингибирующий эффект 2,4-Д увеличивается при повторном прибавлении в среду питания в последующих друг другу пассажах. Малорезистентный каллус штамма В прекращает рост уже во втором пассаже на среде с 5 мг/л 2,4-Д, относительно резистентный каллус штамма С может расти на среде с повышенным содержанием 2,4-Д в течение 4 - 5 пассажей, но не больше.

При продолжительном культивировании на среде с 20 мг/л 2,4-Д обнаруживаются и цитогенетические изменения, не встречающиеся при однократном воздействии 2,4-Д, а именно: повышение степени ploидности и увеличение количества хромосомных aberrаций. Следовательно, как гербицидный (т.е. токсический), так и мутагенный эффекты 2,4-Д зависят от продолжительности действия этого биологически активного вещества. Это значит, что при определении мутагенного действия 2,4-Д нельзя ограничиваться результатами однократной обработки соответствующих объектов данным гербицидом, а надо исследовать и его продолжительное действие.

Выводы

1. Наши исследования показывают, что гербицидное действие 2,4-Д зависит, кроме дозы применения, еще и от внутренних свойств возделываемых тканей и клеток и по-разному проявляется у трех изученных штаммов каллуса гаплопаннуса.

2. Дифференциальная резистентность каллусных тканей гаплопаннуса в отношении 2,4-Д коррелируется с темпом роста и частотой хромосомных aberrаций соответствующих штаммов. Со степенью ploидности такой корреляции не обнаружено.

3. Мутагенный эффект однократного действия 2,4-Д, в примененных нами дозах, на хромосомном уровне (в степени ploидности и частоте aberrаций) изученных штаммов или отсутствует или проявляется в усилении характерной для данного

штамма тенденция изменчивости хромосомных наборов.

4. Как гербицидный, так и мутагенный эффекты 2,4-Д имеют кумулятивный характер: со временем (при повторном воздействии в следующих друг за другом пассажах) соответствующее действие 2,4-Д проявляется сильнее.

Л и т е р а т у р а

1. Apelbaum, A., Burg, S.P. Effects of ethylene and 2,4-D on cellular expansion in *Pisum sativum*. *Plant Physiol.*, 1972, 50, 1, 125-131.
2. Crafts, A.S., The chemistry and mode of action of herbicides. New York - London, 1961.
3. Faludi, B. The effect of phenoxyacetic acid on the growth and herbicide resistance of plant tissues. *Symp. Biol. Hung.*, 1963, 3, 141-148.
4. Faludi, B. Genetical differences in the sensitivity to 2,4-D herbicide. *Ann. Univ. Scient. Budapest Sec. biol.*, 1964, 7, 73-75.
5. Grant, W.F. Pesticides - subtle promoters of evolution. *Symp. Biol. Hung.*, 1972, 12, 43-50.
6. Mohandas, T., Grant, W.F. A relationship between nuclear volume and response to auxin herbicides for some weed species. *Can. J. Bot.*, 1973, 51, 6, 1133-1136.
7. Olson, P.J., Zalik, S., Breakley, W. J., Brown, D. A. Sensitivity of wheat and barley at different stages of growth to treatment with 2,4-D. *Agron. J.*, 1951, 43, 77-83.
8. Unrau, J., Larter, E.N. Cytogenetical response of cereals to 2,4-D. *Can. J. Bot.*, 1952, 30, 22-27.
9. Whitworth, I.W. The reaction of strains of field bindweed to 2,4-D. *Weeds*, 1964, 12, 57-58.
10. Williams, I.H. Differential varietal response of root tissues to exogenous growth regulators in soybeans, oats and corn. *Agron. J.*, 1953, 45, 293-297.

11. Amer, S., Ali, E.M. Cytological effects of pesticides. *Cytologia*, 1969, 34, 4, 533-540.
12. Chung-Le, G. Effects of chemical and physical factors on the chromosome number in *Hicotiana* anther callus cultures. *In vitro*, 1972, 7, 6, 381-386.
13. Crocker, B. Effects of 2,4-D and 2,4,5-T on mitosis in *Allium cepa*. *Bot. Gaz.*, 1953, 114, 3, 274-283.
14. Epstein, S.S., Legator, M.S. The Mutagenicity of Pesticides. Concepts and Evaluation. Cambridge, Mass. 1971.
15. Kallak, H., Yarvekylg, L. On the cytogenetic effects of 2.4-D on pea callus in culture. *Acta biol. Sci. hung.*, 1971, 22, 1, 67-73.
16. Libbenga, K.R., Torrey, J.G. Hormone-induced endoreduplication prior to mitosis in cultured pea root cortex cells. *Amer. J. Bot.*, 1973, 60, 4, 293-299.
17. Mohandas, T., Grant, W.F. Cytogenetic effects of 2.4-D and amitrole in relation to nuclear volume and DNA content in some higher plants. *Can. J. Genet. and Cytol.*, 1972, 14, 4, 773-783.
18. Mühlring, G.N., Van't Hof, I., Wilson, G.B., Grigsby, B.H. Cytological effects of herbicidal substituted phenols. *Weeds*, 1960, 8, 173-181.
19. Sawamura, S. Cytological studies on the effect of herbicides on plant cells in vivo. *Cytologia*, 1964, 29, 86-102.
20. Shamina, Z.B. Cytogenetic study of tissue culture of *Haplopappus gracilis*. *Symp. Mut. Process*, Prague, 1966, 377-380.
21. Siebert, D. Genetic effects of herbicides: induction of mitotic gene conversion on *Saccharomyces cerevisiae*. *Mut. Res.*, 1974, 22, 111-120.
22. Torrey, J.G. Cytological evidence of cell selection by plant tissue culture media. *Proc. Internat. Conf. Plant Tissue Culture*, Berkeley, 1965, 473-484.

23. Wilson, G.B., Morrison, J.H. Mitotic activity and behavior as an index of chemical effect. *Nucleus*, 1958, 1, 45-46.
24. Wu, K.D., Grant, W.F. Chromosomal aberrations induced in somatic cells of *Vicia faba* by pesticides. *Nucleus*, 1967, 10, 37-46.
25. Каллак Х.И., Ярвекюльг Л.Я. О влиянии 2,4-Д на каллус гороха. В кн.: Генетика и селекция. Материалы I-ой межреспубл. конф. по проблемам генетики и селекции. Вильнюс, 1971, 152-153.
26. Каллак Х.И., Ярвекюльг Л.Я. О цитогенетическом эффекте 2,4-Д в культуре растительных тканей. Тезисы работ II съезда ВОГИС-а. М., 1972, 124.
27. Куринный А.И., Пилинская М.А. Пестициды как мутагенный фактор окружающей среды. *Цитол. и генетика*, 1974, 8, № 4, 342-373.
28. Пилинская М.А. Цитогенетический эффект гербицида 2,4-Д на хромосомы человека и животных. *Цитол. и генетика*, 1974, 8, 3, 202-206.
29. Строев В.С. Цитогенетическая активность гербицидов - симазина и гидразида малеиновой кислоты. *Генетика*, 1968, 4, № 12, 130-134.
30. Мережинский Ю.Г. Летальное воздействие биологически активных соединений на растительную клетку. В кн.: Регуляция метаболизма растительной клетки. Киев, 1973, 184-220.
31. Чкаников Д.И., Соколов М.С. Гербицидное действие 2,4-Д и других галонидфеноксикислот. М., 1973.
32. Murashige, T., Skoog, H.A. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiol. plant.*, 1962, 15, 473-497.
33. Урбах В.Ю. Математическая статистика для биологов и медиков. М., 1963.

On Cytogenetic Characterization of 2.4-D Action
on the Callus Tissues of Haplopappus Gracilis

H.Kallak, U.Kaarep

S u m m a r y

The effect of the auxine-like herbicide 2.4-D (at concentrations of 1, 5, 10, 20 and 50 mg/litre) on three callus strains excised from stem segments of Haplopappus gracilis and subcultured for 5.5 - 9.5 years on a solid medium by Murashige and Skoog was studied.

It was found that the herbicidal (growth inhibiting) effect of 2.4-D is dependent on the concentration of the compound and the duration of its influence, as well as on the specific characteristics of the tissues. Thus the differential resistance of the treated strains to 2.4-D correlates with their growth rate and with the frequency of aberrant ana- and telophases (in the form of fragments and bridges) in their mitotic cells: the lower the growth intensity and the higher the frequency of aberrations, the greater the resistance of corresponding callus strain. No evident correlation between the resistance to 2.4-D and the ploidy level of the treated callus tissue was found.

2.4-D didn't cause any remarkable mutagenic effect on the chromosome level of the callus strains treated only once with this compound. In this case the cytogenetic effect of 2.4-D was limited to the intensification of the tendencies present in the chromosomal variation of the corresponding strain. Under a long-term influence of 2.4-D during 4-5 passages of subculturing the herbicidal as well as the mutagenic effect of 2.4-D on callus tissue intensified. The mutagenic effect of 2.4-D manifested itself in the increase of ploidy level and the frequency of aberrations of treated callus.

О МОРФОЛОГИИ И ДЕЛЕНИИ ЯДЕР РАСТИТЕЛЬНЫХ КЛЕТОК В УСЛОВИЯХ КУЛЬТУРЫ ТКАНИ

Х. Каллак, Л. Ярвекюльг

Для растительных клеток *in vitro* характерна карбиологическая изменчивость: варьируются число и форма ядер, изменяются хромосомные наборы, обнаруживаются отклонения от нормального течения митоза /1-15/.

Нередко в культурах ткани встречаются клетки с веретеновидными, лепастными или иного типа полиморфными ядрами, значение которых пока не выяснено, хотя само явление не ново и наблюдается также в клетках интактных растений и животных /16-19/. Поскольку полиморфные ядра чаще всего встречаются в клетках с высокой физиологической активностью, то предполагают, что их функция заключается в улучшении ядерно-цитоплазматических отношений в крупных (и часто полиплоидных) клетках /16, 18, 21/. До настоящего времени не существует единого мнения о способе возникновения полиморфных ядер: появляются ли они только в результате нарушений митоза /20-22/, или возможны и другие модусы возникновения, как, например, фрагментация, почкование или слияние ядер /15-18, 20/.

Не приходится сомневаться в заключении многих исследователей относительно того, что в культуре растительной ткани большинство клеточных ядер делится митотическим путем, хотя при этом и обнаруживаются разные отклонения от нормы. Но до настоящего времени объектом дискуссии является амитотическое деление ядер и его значение в жизни клеток /19-23, 25/. Сравнение и оценка разных положений в отношении строения и способов деления ядер усложняются из-за отсутствия единой терминологии у разных авторов.

Литературные сведения о морфологии и делении ядер в растительных культурах ткани пока малочисленные и неполные. В большинстве случаев они являются лишь побочными данными, полученными при исследовании иных явлений. Поэтому обнаружение полиморфных ядер и амитотических фигур в каллусных культурах, являющихся объектом наших исследований, вызвало у нас интерес к этому вопросу.

Материал и методика

Объектом исследования служили недифференцированные каллусные ткани, изолированные от семян гороха посевного (*Pisum sativum* L., сорт "Кийр"), от стеблевых сегментов гаглопаппуса (*Harporarpus gracilis* (Nutt.) Gray) и от стеблевых сегментов табака (*Nicotiana tabacum* L.). Изученные нами каллусные культуры выращивали в течение нескольких лет на соответствующей агаровой питательной среде: каллус гаглопаппуса — на среде по Мурасиге и Скугу, каллус гороха — на среде по Торри и каллус табака — на среде по Уайту и Геллеру. В основную среду добавляли соответствующие биологически активные вещества (ИУК, 2,4-Д, аденин, кинетин, гидролизат казеина). Каллусные ткани культивировались в темноте при температуре $+26$ до $+27^{\circ}\text{C}$.

Для цитологических исследований кусочки каллуса фиксировали в смеси этилового спирта и ледяной уксусной кислоты (3:1) и приготавливали временные давленные препараты стандартным методом ацеторсеина. Для контроля некоторые препараты окрашивали по Фельгену.

Результаты исследований

Наши многолетние исследования каллусных культур гаглопаппуса, гороха и табака показали, что в клетках этих культур встречаются ядра разной величины и формы.

В а р ь и р о в а н и е р а з м е р о в я д е р объясняется тем, что в условиях культуры для растительных клеток характерна полиплоидизация. К тому же все изученные нами каллусные штаммы были гетероплоидные, т.е. состояли из клеток с разной степенью плоидности.

В каллусе табака ($2n = 48$) преобладали диплоидные клетки и близкие к ним анеуплоидные клетки. Каллусные штаммы же гаглопаппуса ($2n = 4$) были полностью полиплоидные, причем большинство их клеток содержало 12–16 хромосом. Штаммы каллуса гороха ($2n = 14$) содержали как диплоидные, так и полиплоидные (в основном три- и тетраплоидные) клетки. При увеличении числа хромосомных наборов происходит, как правило, увеличение (хотя не всегда равномерное) объема ядра. О пределах изменчивости размеров ядер в каллусных клетках можно

судить по микрофотографии (рис. I).

В каллусных клетках наряду с шарообразными ядрами нередко встречались еще веретеновидные, лопастные и другие с отклонением от обычной формы полиморфные ядра. Можно было проследить все переходные ступени ядерных фигур от слабо лопастных до полностью фрагментированных на отдельные участки (рис. 2, 3).

Среди полиморфных встречались и амитотические и е фигуры ядер. Так, в каллусных клетках табака обнаруживались все следующие друг за другом фазы постепенного перешнурования ядер — от малозаметных перетяжек до полного разделения на дочерние ядра с одним только нитевидным мостиком между ними (рис. 4). Такие же фигуры ядер встречались, хотя несколько реже, и в каллусах галлопаппуса и гороха.

Многие ядра каллусных клеток отличались чрезвычайно увеличенными размерами ядрышек, свидетельствующими об интенсификации процессов биосинтеза (рис. 5а). Заметно варьировало и число ядрышек по ядрам. Последнее можно было ожидать, принимая во внимание гетероплоидность большинства клеток каллусных культур. В диплоидном хромосомном наборе гороха различают две пары хромосом со спутниками, т.е. с ядрышковыми организаторами /26/. На рисунке 5б показано крупное ядро каллусной клетки гороха, число ядрышек которого около двадцати.

При характеристике морфологии ядер растительных клеток в условиях культуры ткани следует отметить также явление укупленных хромосомных центров. Ядра с такими хромосомами мы наблюдали во всех каллусных культурах (рис. 6).

По литературным данным, а также и по нашим предыдущим исследованиям, известно, что ядра каллусных клеток в большинстве случаев делятся митотически. Разные каллусные культуры отличаются своим уровнем и динамикой митотической активности, которые зависят, кроме внешних условий культивирования, также и от внутренней специфики соответствующих культур /6-8, 27/. После очередного пассирования наступает так называемый лаг-период (3-5 дней), в течение которого митотическая активность практически отсутствует.

Вслед за этим следует период интенсивного роста (от 2-3 недель до 2-3 месяцев) с одним или с несколькими пиками частоты митоз. После этого митотическая активность постепенно снижается и субкультуру следует пассировать на свежую среду.

Митозы встречались как в диплоидных, так и в полиплоидных клетках каллуса. Во всех изученных нами культурах обнаружилось, наряду с нормальными фигурами митоз, также митозы с разными аномальными отклонениями.

Так, наряду с метафазами с нормальным равномерным расположением хромосом, встречались, например, метафазы с сегрегацией хромосом на отдельные группы (рис. 7). Метафазные хромосомы отдельных клеток резко различались по степени конденсации, причем заметно варьировали их размеры. Иногда хромосомы отличались настолько укороченными размерами, что можно было предполагать наличие псевдополиплоидии (рис. 8).

Большим разнообразием отклонений выделялись анафазы в каллусных клетках. Обнаружились всевозможные переходы от нормального равномерного распределения хроматид до полного отсутствия последнего. Часто можно наблюдать ана- и телофазы с фрагментами или с дицентрическими хроматидами (хромосомами) в виде "мостов", свидетельствующими о хроматидных (хромосомных) абберациях (рис. 9).

Наряду с нормальным разъединением хроматид и распределением этих же хроматид на противоположных полюсах клетки, наблюдалась и соматическая редукция, т.е. распределение в анафазе целых дихроматидных хромосом (рис. 10а). Своеобразный случай зафиксирован на рисунке 10б, где в одной клетке представлены как отдельные разъединившиеся хроматиды, так и дихроматидные неразделившиеся хромосомы.

Среди других отклонений от нормального хода митоза встречались еще и триполярные анафазы (рис. 10в).

Нарушения нормального хода анафазы могут привести к изменениям в числе хромосом, в первую очередь — к анеуплоидии. Анеуплоидные клетки наблюдались во всех изученных нами каллусных культурах, но особенно выделялся в этом отношении один из штаммов каллуса гороха, у которого в 25-ом пассаже преобладали гипертриплоидные клетки с 22-23 хромосомами (рис. 11).

После митотического деления ядер обычно происходит деле-

ние цитоплазмы - цитокинез, в результате которого образуются две дочерних клетки. В каллусных культурах нередко встречались многоядерные клетки, свидетельствующие о несостоявшемся цитокинезе (рис. 12). Иногда можно было наблюдать незаконченный цитокинез, напоминающий дробление, как на представленной микрофотографии (рис. 13а) каллусной клетки гороха (с несколькими протопластами внутри одной только оболочки). На возможность быстрого многократного деления каллусных клеток в виде дробления указывает и микрофотография группы маленьких меристематических клеток внутри крупной паренхимной клетки табака, которая сфотографирована с микротомного препарата (рис. 13б).

Обнаруженные нами многочисленные амитотические фигуры ядер в каллусных клетках у всех изученных культур позволяют предположить, что многоядерные клетки возникают в результате несостоявшегося цитокинеза не только за митозом, но и за а м и т о з о м. Нельзя отрицать также возможность образования многоядерных клеток вследствие ф р а г м е н т а ц и и крупных полиплоидных ядер на несколько дочерних ядер. Подобный случай приведен на микрофотографии каллусной клетки гороха (рис. 14).

Признав возможность амитотического деления ядер в условиях культуры ткани, необходимо учитывать, что за амитоз можно иногда принять сильно видоизмененные нарушенные митозы, или так называемые п с е в д о а м и т о з ы. Сегрегация про- и метафазных хромосом, а также дицентрические и отстающие ана- и телофазные хромосомы могут привести к образованию полиморфных, в том числе и гантелевидных, амитотических фигур ядер. На нескольких микрофотографиях представлены нарушенные митозы, в результате которых могли бы возникнуть полиморфные ядра (рис. 15).

наши исследования показывают, что в каллусных клетках нередко происходит К - м и т о з, т.е. разъединение хроматид без образования митотического аппарата. Обнаруживаются характерные для К-митоза диплохроматиды (рис. 16). Поскольку К-митоз не ведет к делению ядра, хотя и при этом увеличивается число хромосом, то его можно считать одним из способов полиплоидизации каллусных клеток *in vitro*.

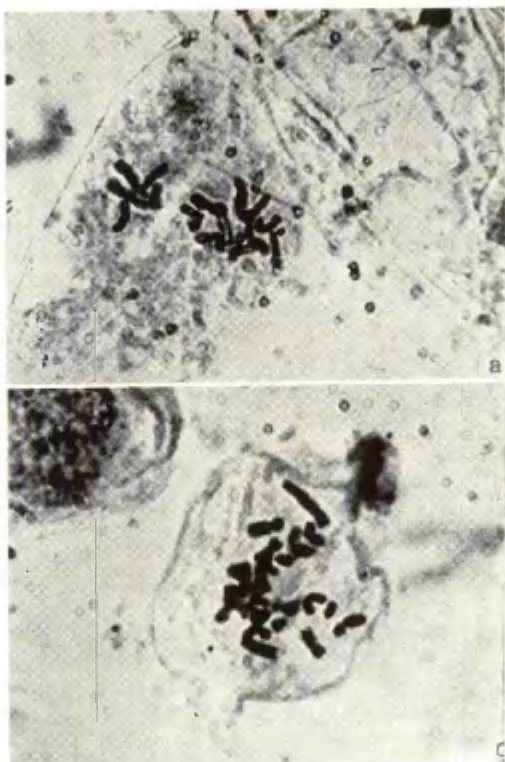


Рис. 1. Варьирование размеров ядер в каллусных клетках гороха. $\times 410$.

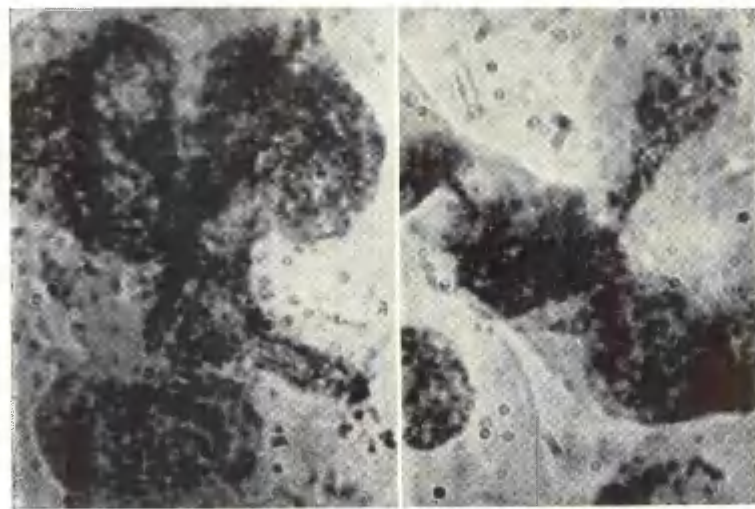


Рис. 2. Полиморфные ядра в каллусных клетках табака. $\times 1620$.

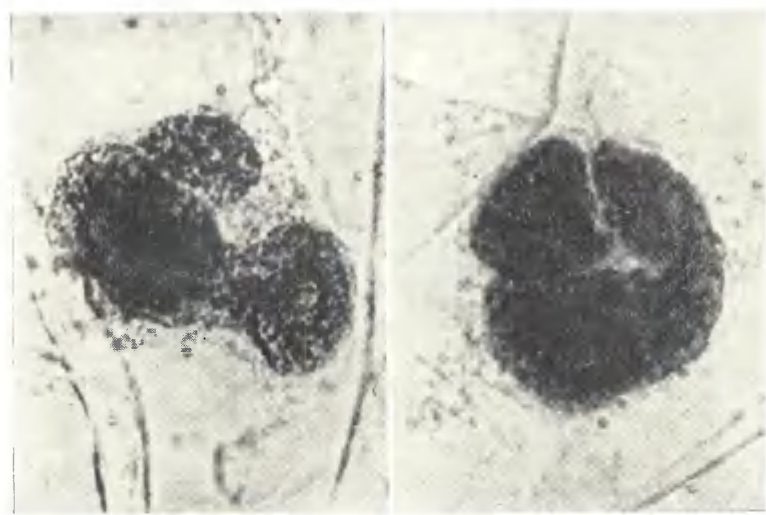


Рис. 3. Полиморфные ядра в каллусных клетках гороха. $\times 1620$.

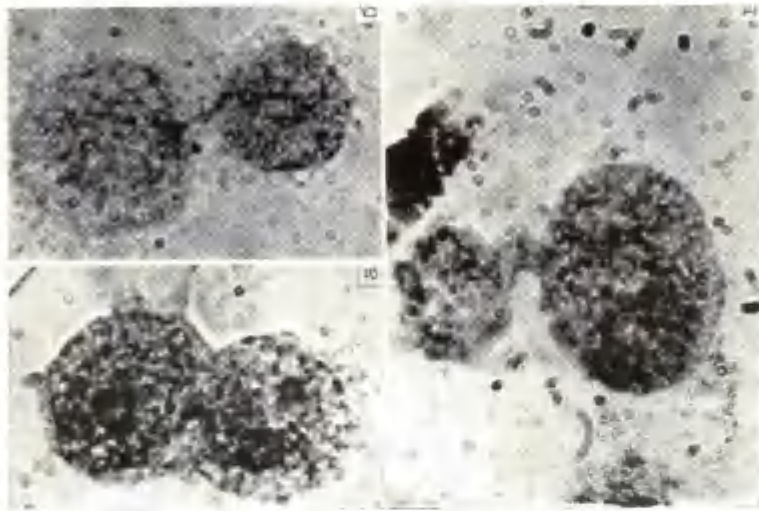


Рис. 1. Антиотические ядра: а) и б) в каллусе табака, в) в каллусе гороха $\times 1620$.

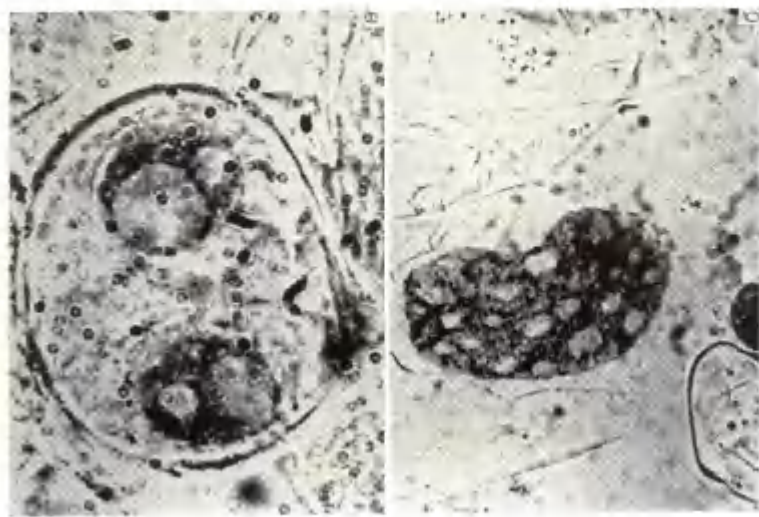


Рис. 5. Ядрышки в каллусных клетках гороха: а) крупные ядрышки $\times 1620$; б) большое количество (~ 20) ядрышек в ядре $\times 810$.

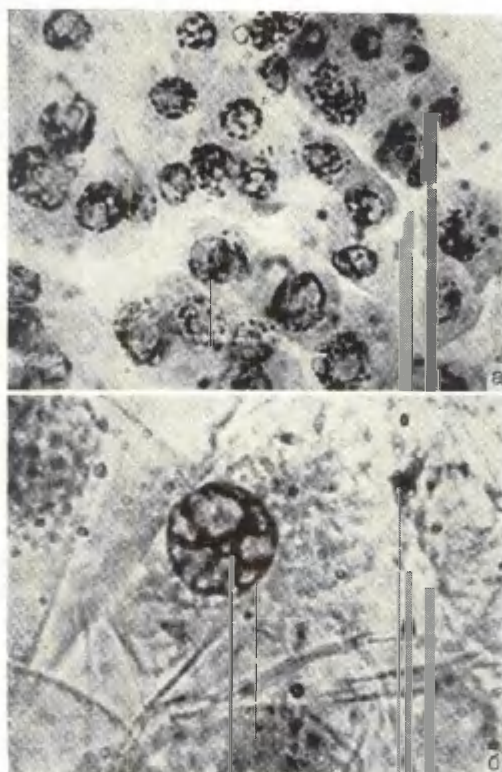


Рис. 6. Укрупненные хромоцентры: а) в ядрах каллуса гороха. $\times 810$. б) в ядре каллуса табака. $\times 1620$.

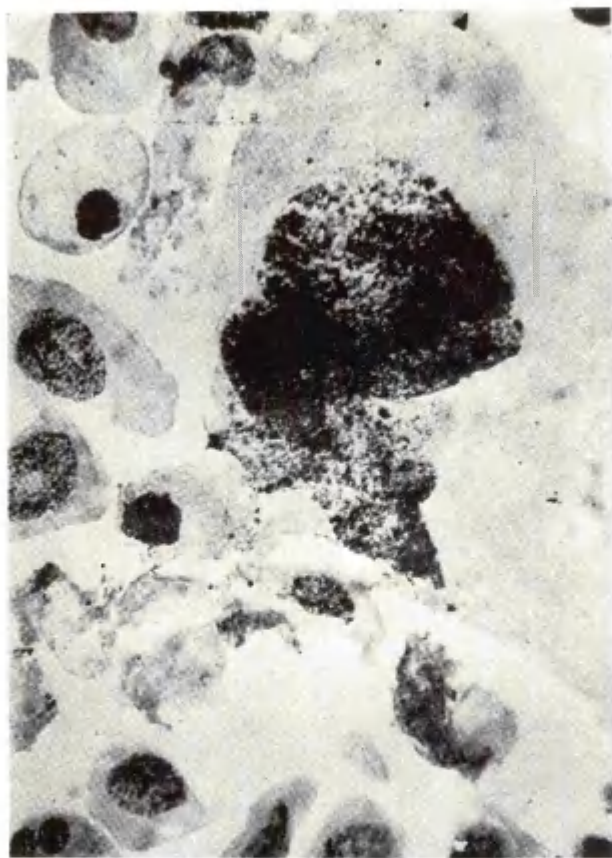


Рис. 7. Сегрегация хромосом в мстафазе: а) в каллусной клетке гаплопаппуса, б) в каллусной клетке гороха. $\times 1620$.

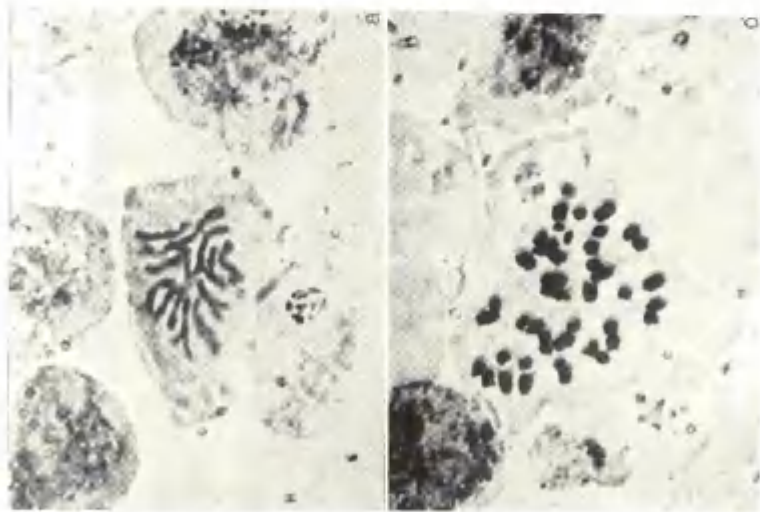


Рис. 8. Метафазные хромосомы в каллусных клетках гороха: а) с типичными размерами, б) сильно конденсированные. $\times 1620$.

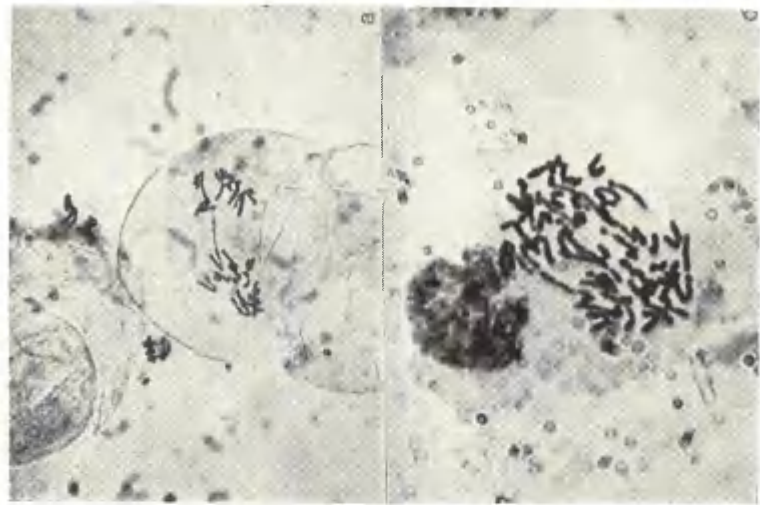


Рис. 9. Аберрантные анафазы: а) в каллусной клетке гаплопептуса, $\times 810$, б) в каллусной клетке гороха. $\times 1620$.

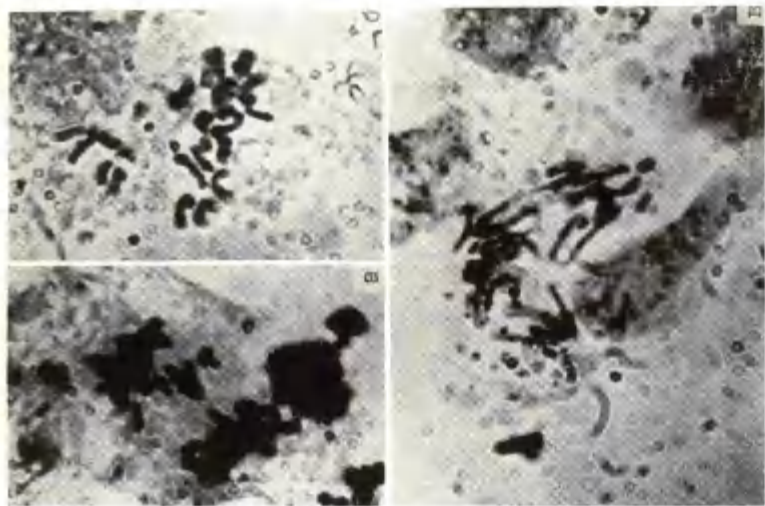


Рис. 10. Аберративное распределение хромосом в каллусных клетках гороха: а) соматическая редукция, б) частичное разделение хромосом, в) триполярная анафаза. $\times 1620$.

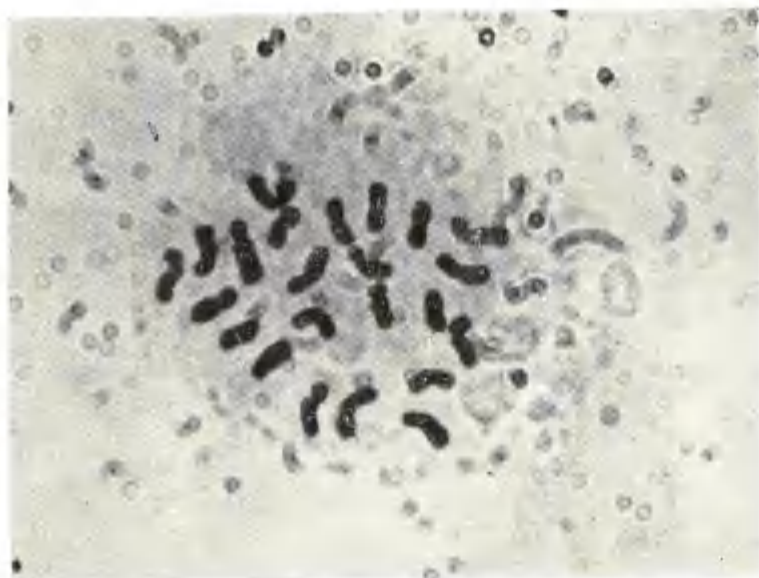


Рис. 11. Гипертриплоидная клетка из каллуса гороха. $\times 1620$.

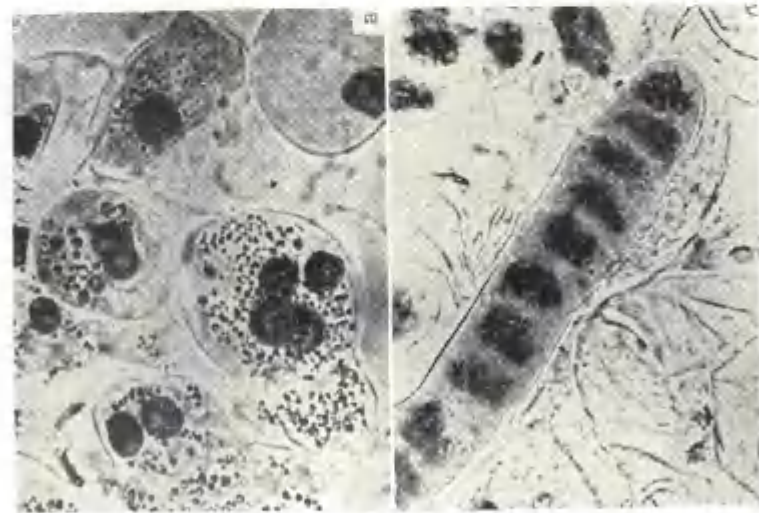


Рис. 12 (а, б). Многоклеточные клетки из
калуса гороха. $\times 810$.

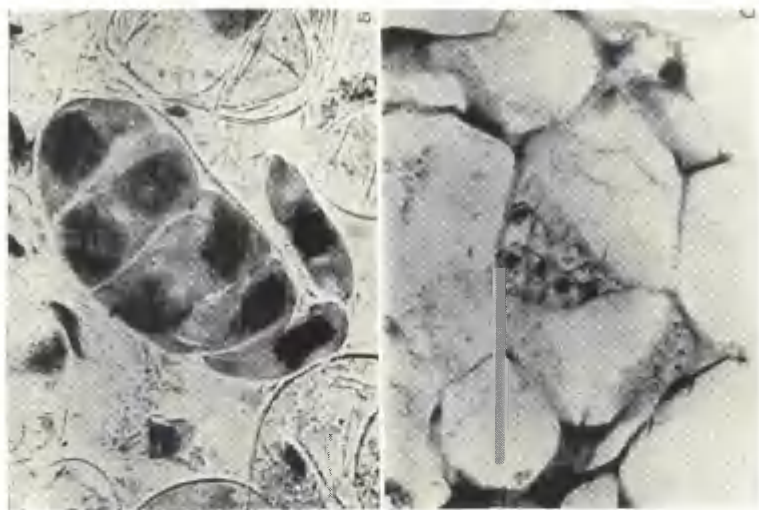


Рис. 13. Деление путем дробления: а) в
калусной клетке гороха. $\times 570$, б) в кал-

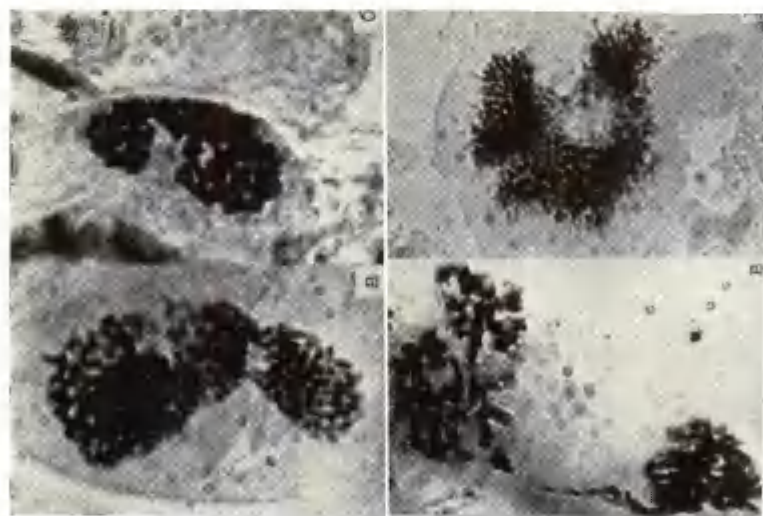


Рис. 15. Нарушение митозы в клетках каллуса гороха, в результате которых могли бы образоваться полиморфные ядра; а, б, в — $\times 1620$, г — $\times 810$.

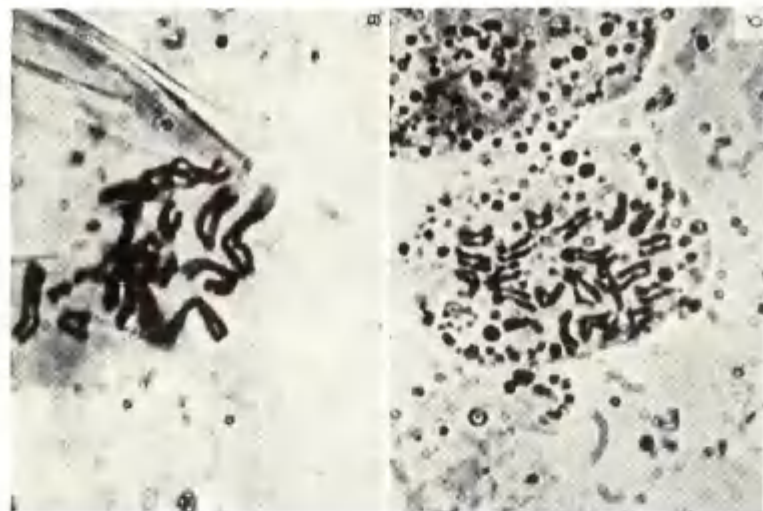


Рис. 16. К-митозы в каллусных клетках; а) гаплопануса, б) тороха, $\times 1620$.

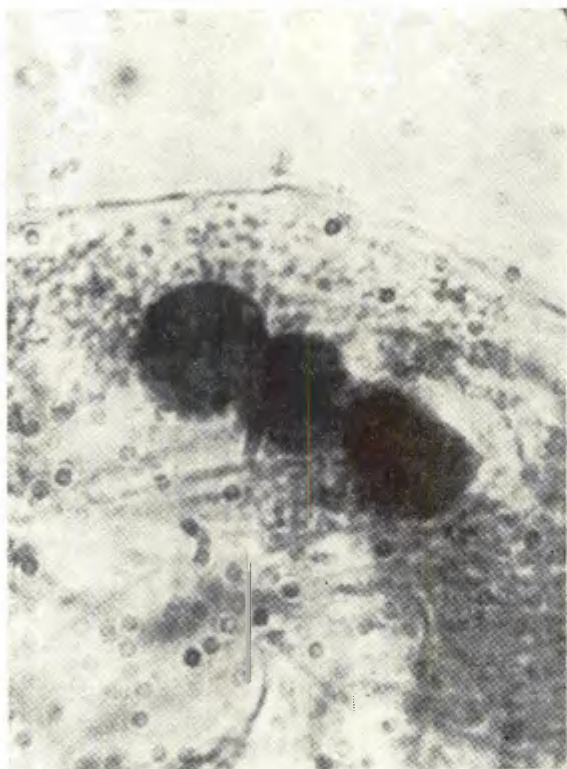


Рис. 14. Фрагментирующееся ядро в каллусной
клетке гороха. $\times 1620$.

Обсуждение

Приведенные нами микрофотографии свидетельствуют о разнообразии в строении и способе деления ядер в условиях культуры растительной ткани. "Условия культуры ткани" следует понимать, с одной стороны, как освобождение клеток от регулирующих влияний целого организма, а, с другой стороны, как подчинение этих же клеток воздействию новых не встречающихся в интактных организмах факторов.

Можно предполагать, что условия культивирования оказывают на каллусные клетки разное воздействие. Так, средой питания, температурой, освещением и др. факторами культивирования определяется проявление генетической информации каллусных клеток в пределах свойственной им нормы реакции. Разумеется, *in vitro* генетическая информация реализуется несколько иначе чем *in vivo*. При этом не исключаются и вариации в строении и в способе деления ядер. Такие явления, как необычное увеличение хромоцентров, связывающееся с амплификацией определенных локусов /15,28,29/, а также увеличение объема ядрышек поверхности ядра в виде полиморфных ядер или многоядерных клеток, говорят в пользу усиления функциональной активности клеток в условиях культуры. О повышенном уровне процессов метаболизма каллусных культур свидетельствуют также фрагментация и амитотическое деление ядер, происходящие без нарушения организации и функциональной активности клеток.

Условия культивирования, кроме реализации генетической информации в пределах нормы реакции, по-видимому, индуцируют изменения в самой генетической информации, т.е. условия культивирования являются мутагенными. Многими исследователями, а также и нами показаны изменения строения и числа хромосом в каллусных клетках, и установлена тенденция к полиплоидизации. В пользу возможности полиплоидизации каллусных клеток *in vitro* свидетельствует частое появление К-митозов, наблюдавшееся нами во всех изученных культурах. В роли мутагенов могут выступать разные компоненты среды питания, содержащей такие биологи-

чески активные вещества, как ауксины, кинины, витамины и др. Нашими исследованиями показано, например, мутагенное действие широко используемого в настоящее время синтетического ауксина (и гербицида) 2,4-Д на каллусные культуры /30/.

Наконец, можно допустить, что условия культивирования оказывают селективное действие на популяцию каллусных клеток *in vitro* и тем самым дифференциально благоприятствуют жизнедеятельности и делению гетероплоидных клеток. Исходя же из явления полиплоидизации растительных культур тканей, следует предположить, что именно полиплоидные клетки приобретают в культуре какие-то преимущества перед диплоидными клетками и превосходят последние своей митотической активностью. Как уже выше отмечено, полиплоидные клетки могут вновь образоваться под воздействием условий культуры. Но вполне допустима и такая возможность, что уже в первичных эксплантатах содержатся полиплоидные клетки, которые редко делятся в тканях интактного организма, но способны делиться *in vitro*. Ведь явление полисоматии, т.е. вариация степени плоидности в различных тканях и клетках, широко распространено, особенно у растений /31-35/.

Полиплоидизация, в свою очередь, сопровождается изменениями в форме и способе деления ядер. Как известно, полиморфными являются прежде всего полиплоидные ядра /18,23,36/. С другой стороны, амитотическое деление и фрагментацию ядер рассматривают как нормализацию ядерно-цитоплазматических отношений в крупных полиплоидных клетках.

Таким образом, можно заключить, что условия культивирования по-разному действуют на каллусные клетки и вызывают кариологическую изменчивость, проявляющуюся как в форме, так и в способе деления ядер. Но при всей достоверности такого заключения нельзя упускать из виду другой аспект данного явления: отсутствие в условиях культуры регулирующего влияния целостного организма, исправляющего многие структурные и функциональные нарушения в интактном состоянии. Иначе говоря, необходимо учитывать, что все вышеописанные вариации в форме и в способе деления ядер имеют место и в клетках интактного организма, однако проявляются они значи-

тельно реже из-за корректирующего действия разных регуляторных систем. Культуры же ткани, вследствие отсутствия таких регулирующих систем, являются удобным объектом исследования кариологической изменчивости и ее зависимости от различных условий.

Выводы

1. В клетках каллусных культур гороха, гаглопаппуса и табака обнаруживается разнообразие формы и величины ядер. Наряду с правильными округлыми и овальными фигурами ядер встречаются еще и неправильные веретенообразные, лопастные, гантелевидные и другие полиморфные ядра. Заметно варьируют объем ядер, а также число и объем ядрышек по ядрам.

2. Ядра каллусных клеток в основном делятся митотически, хотя и обнаруживаются разные отклонения от нормального течения митоза (сегрегация хромосом в метафазе, неправильное распределение хроматид в анафазе и др.). Нередко в каллусных клетках встречаются К-митозы и проявляются амитотические фигуры ядер.

3. Описанные особенности строения и деления ядер в каллусных клетках можно свести к сверхмерной репродукции на разных уровнях клеточной организации: к амплификации, к полиплоидизации, к неограниченной пролиферации. Повышение репродуктивной деятельности каллусных клеток объясняется специфическими условиями *in vitro*: отсутствием регуляторных систем интактного организма и соответствующим воздействием факторов культивирования, т.е. модифицированной реализацией генетической информации в пределах нормы реакции, а также индуцированием хромосомных мутаций и селекцией в клеточных популяциях.

Л и т е р а т у р а

- I. Mitra, J., Mapes, M., Steward, F. Growth and organized development of cultured cells. IV The behavior of the nucleus. Amer. J. Bot., 1960, 47, 5, 357-368.

2. Venkateswaran, S. Tissue culture studies on *Vicia faba*. II Cytology. *Caryologia*, 1963, 16, 1, 91-100.
3. Murashige, T., Nakano, R. Tissue culture as a potential tool in obtaining polyploid plants. *J. Heredity*, 1966, 52, 4, 114-118.
4. Shamina, Z.B. Cytogenetic study of tissue culture of *Naplopappus gracilis*. Mechanism of Mutation and Inducing Factors. Sympos. on Mutational Process, Prague, 1966, 377-380.
5. Shimada, T., Tabata, M. Chromosome numbers in cultured pith tissue of tobacco. *Japan. J. Genetics*, 1967, 42, 195-201.
6. Kallak, H. Cell division and chromosome numbers in the tissue culture of *Nicotiana tabacum*. *Biol. Plant.*, 1968, 10, 3, 199-204.
7. Каллак Х.И., Ярвекыльг Л.Я. О морфологической и цитологической разнокачественности каллуса гороха. *Цитология и генетика*, 1968, 2, 5, 408-414.
8. Каллак Х.И., Ярвекыльг Л.Я. О цитогенетической характеристике каллуса гороха. В кн.: *Культура изолированных органов, тканей и клеток растений*. М., 1970, 140-144.
9. Demoise, C.F., Partanen, C.R. Effects of subculturing and physical conditions of medium on the nuclear behavior of plant tissue culture. *Amer.J. Bot.*, 1969, 56, 2, 147-152.
10. Као, К.М., Miller, H.A., Gamborg, O.L., Harvey, B.L. Variations in chromosome number and structure in plant cells grown in suspension cultures. *Can. J. Genetics and Cytol.*, 1970, 12, 2, 297-301.
- II. Зосимович В.П., Левенко Б.А., Юркова Г.Н., Легейда В.С. Выделение штаммов *Srepis capillaris* различной плоидности в культуре ткани. Докл. АН СССР, 1972, 203, 5, 1188-1189.
12. Сидоренко П.Г., Кунах В.А. Получение культуры изолированных тканей *Naplopappus gracilis* и *Srepis capill-*

- laris и их цитогенетическая характеристика. Цитология и генетика, 1972, 6, 6, 483-486.
13. Равкин А.С., Попов Ю.Г. Митотическая активность, геномные и хромосомные изменения в клетках культуры ткани яблоки. Цитология и генетика, 1973, 7, I, 33-36.
 14. Baylies, M.W. Origin of chromosome number variation in cultured plant cells. Nature, 1973, 246. 5434, 529-530.
 15. Nuti Ronchi, V., Bennici, A., Martini, G. Nuclear fragmentation in dedifferentiating cells of *Nicotiana glauca* pith tissue grown in vitro. Cell Differentiation, 1973, 2, 77-85.
 16. Goldstein, B. Nuclear form as related to functional activities of normal and pathological cells. Bot. Gaz., 1928, 86, 365-383.
 17. Levan, A. The effect of colchicine on the root mitoses in *Allium*. Hereditas, 1938, 24, 471-486.
 18. Nagl, W. Spontane Fragmentation endopolyploider Kerne in Dauergewebe von *Allium*-Arten. Osterr. Bot. Z., 1970, 118, 431-442.
 19. Pflza, V. Lebendbeobachtungen der Amitose in der Gewebekultur. Z. Zellforsch., 1963, 61, 159-167.
 20. Bucher, O. Amitose. In: Der Zellkern. Berlin-Heidelberg-New York, 1971, 626-699.
 21. Бродский В.Я. Трофика клетки. М., 1966.
 22. Cooper, L.S., Cooper, D.O., Hildebrandt, A.C., Riker, A.J. Chromosome numbers in single cell clones of tobacco tissue. Amer. J. Bot., 1964, 51, 3, 645-649.
 23. Сидоров Е.Н., Соколов Н.Н. Блокада веретена как причина образования полиморфных ядер в полиплоидных клетках. Цитология, 1965, 7, 5, 645-649.
 24. Tschermak-Woess, E. Endomitose. In: Der Zellkern. Berlin-Heidelberg - New York, 1971, 569-625.

25. Прокофьева-Бельговская А.А. Материальные основы наследственности. В кн.: Актуальные вопросы современной генетики. М., 1966, 23-24.
26. Blixt, S. Cytology of Pisum. II The normal karyotype. Agri Hort. Genetica, 1958, 16, 3-4, 221-237.
27. Каллак Х.И., Ярвекылг Л.Я. Цитогенетическая характеристика штаммов каллуса гороха. В кн.: Генетика зерновых бобовых культур. Орел, 1972, 7-16.
28. Nagl, W. Evidence of DNA amplification in the orchid *Cymbidium* in vitro. Cytobios, 1972, 5, 145-154.
29. Nagl, W., Rücker, W. Beziehungen zwischen Morphogenese und nuklearem DNS-Gehalt bei aseptischen Kulturen von *Cymbidium* nach Wuchsstoffbehandlung. Z. Pflanzenphysiol., 1972, 67, 2, 120-134.
30. Kallak, H., Yarvekylg, L. On the cytogenetic effects of 2,4-D on pea callus in culture. Acta biol.Sci.hung., 1971, 22, 1, 67-73.
31. Tschermak-Woess, E. Karyologische Pflanzenanatomie. Protoplasma, 1956, 46, 1-4, 798-834.
32. Partanen, C.R. Quantitative chromosome changes and differentiation in plants. In: Developmental Cytology. New York, 1959, 21-45.
33. D'Amato, F.D. Endopolyploidy as a factor in plant tissue development. Caryologia, 1964, 17, 1, 41-52.
34. Sen, R., Bhaduri, P.N. Ploidy level of nodular cells as determined by their nucleolar number and volume. Cytologia, 1969, 34, 2, 202-212.
35. Reese, G. Über einen bemerkenswerten Fall von Polysomatie in Wurzelspitzen. Cytologia, 1973, 38, 4, 593-601.
36. D'Amato, F. Polyploidy in the differentiation and function of tissues and cell in plants. Caryologia, 1952, 4, 3, 311-358.

On Nuclear Form and Division in
Plant Tissue Culture

H. Kallak, L. Järvekülg

S u m m a r y

Different strains of callus excised from pea cotyledons, tobacco pith and the stem segments of Haplopappus gracilis and subcultured on a synthetic agar medium revealed a considerable diversity in the nuclear form and size. Side by side with normal rounded or oval nuclei also lobed, fragmented, amitotic and other polymorphous nuclei of irregular outline were found.

The mitosis, although with various deviations, including C-mitoses, is conceived as the most frequent mode of nucleus division in callus cells. Besides, the occurrence of nuclear division different from the mitosis (amitosis, fragmentation) is admitted.

It is concluded that the peculiarities in the nuclear form and division in callus cells are drawn back to excessive reproduction patterns (amplification, polyploidy, proliferation) under the special conditions of culturing, including both the action of culture medium and the absence of regulatory control by the intact organism.

МОРФОЛОГИЯ ЛИЗОСОМ В КУЛЬТИВИРОВАННЫХ ФИБРОБЛАСТАХ ЭМБРИОНОВ КУРИЦЫ

Д. Кярнер

Вместо однородных мешочкообразных структур, предлагаемых по биохимической концепции лизосом /1,2,3/, описывали очень полиморфные образования разной величины даже в пределах одной ткани. В общем считают, что структура лизосом зависит от их происхождения и функционального состояния /4,5,6/. Но следует отметить, что сама функция лизосом в клетках остается нередко неясной /7/. Таким образом неслучайно, что в изучении лизосом занимает важное место выяснение их превращений и их связей с другими органеллами при разных экспериментальных воздействиях. Именно такие данные излагаются в настоящей работе о лизосомах в культивированных фибробластах эмбрионов курицы до и после витального окрашивания нейтральным красным.

Материал и методика

Материалом служили фибробласты в культурах кожно-мышечной ткани куриных эмбрионов 8-10 суток инкубации. Методика культивации описана ранее /8/. Культуры выращивали в пенициллиновых флаконах на покровных стеклах. В качестве питательной среды чаще всего была использована среда для фибробластов /9/ с составом: синтетическая среда I99 - 10%, плацентарная сыворотка человека - 17%, эмбриональный экстракт - 4%, физиологический раствор Хенкса - 69%. Прижизненному окрашиванию нейтральным красным (5 мкг/мл) были подвергнуты культуры на 2-3 день после посева. В одном варианте опытов культуры исследовались после 15-минутного и 3-часового окрашивания. В другом варианте витально окрашенные культуры переводили в нормальную питательную среду и исследовались в течение 3 часов.

Для электронномикроскопических исследований культуры фиксировали 2,5% раствором глutarальдегида в какодилатном или коллидиновом буфере и дофиксировали 1% раствором четырехоксида осмия в этих буферах. В некоторых опытах культуры

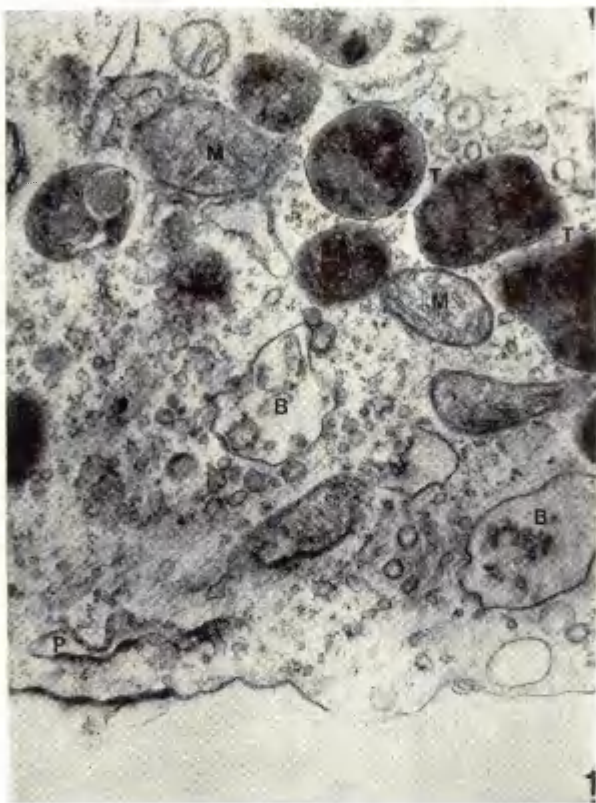


Рис. 1. Плотные тельца (Т) и светлые вакуоли (В) в фибробласте культуры эмбриональной «кожно-мышечной ткани» курицы. Т — плотные тельца; В — светлые вакуоли; М — митохондрии; Р — шероховатая эндоплазматическая сеть. $\times 33\ 000$.

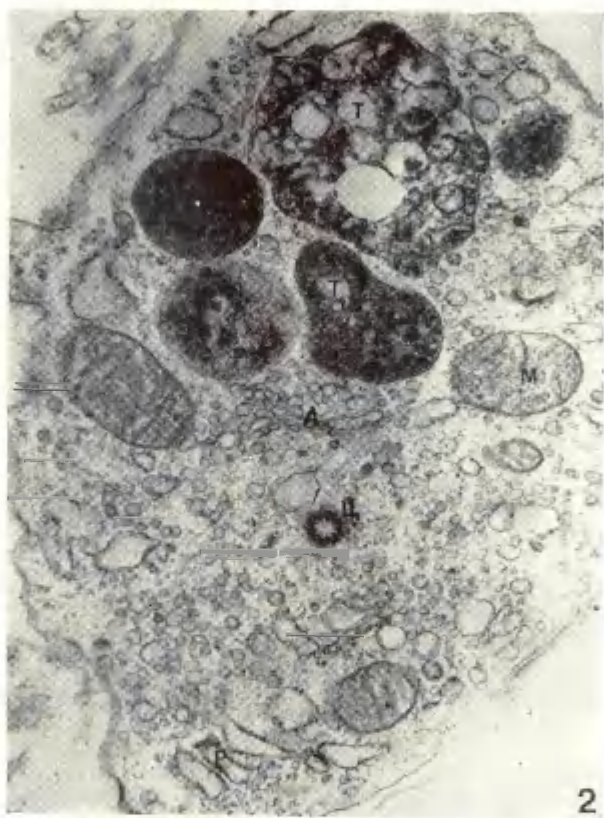


Рис. 2. Плотные тельца вблизи зоны Гольджи в нормальном фибробласте тканевой культуры. Ц — центриоль; Д — диктиосома. Остальные обозначения те же, что и на рис. 1. $\times 33\,000$.

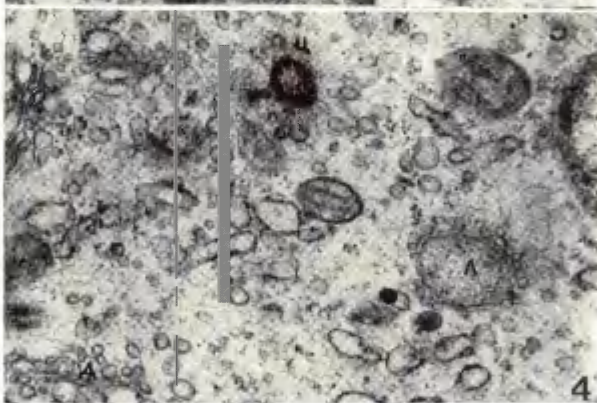
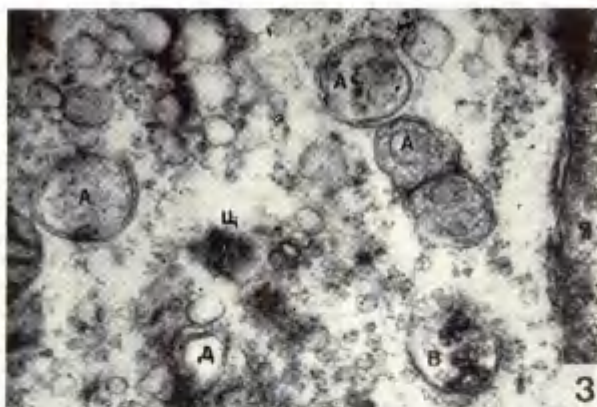


Рис. 3. Аутофагосомы (А) в зоне Гольджи в нормальном фибробласте тканевой культуры. Я — ядро; В — вакуоль; Ц — центриоль; Д — диктиосомы. $\times 30\,000$.

Рис. 4. Аутофагосома (А) тесно окружена мелкими пузырьками. Обозначения те же, что и на рис. 2. $\times 30\,000$.



Рис. 5. Просветленные плотные тельца (Т) и длинные цистерны ШЭР (Р) после 15-минутного витального окрашивания нейтральным красным. К — капли жира. $\times 33\ 000$.

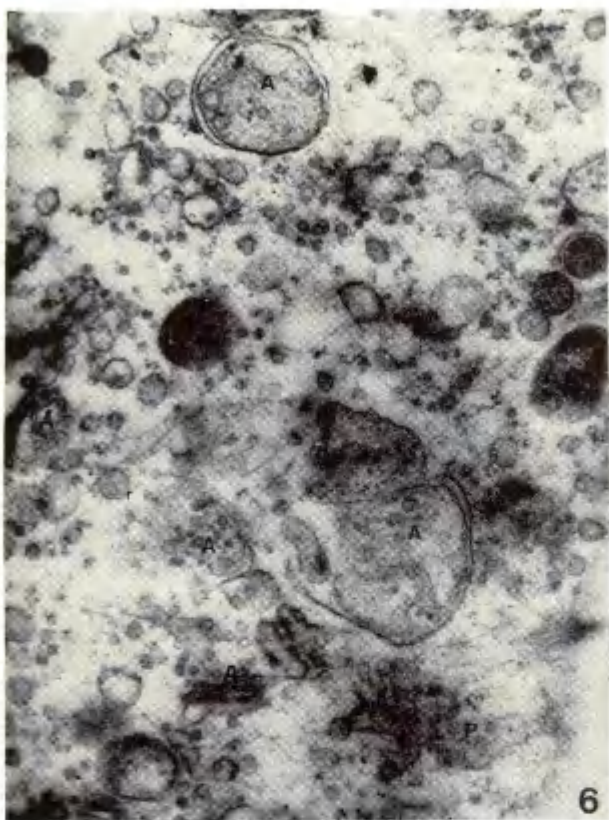


Рис. 6. Зона Гольджи в фибробласте после 15-минутного витального окрашивания нейтральным красным. А — аутофагосомы; Д — диктиосомы; Р — ШЭР. $\times 35\,000$.

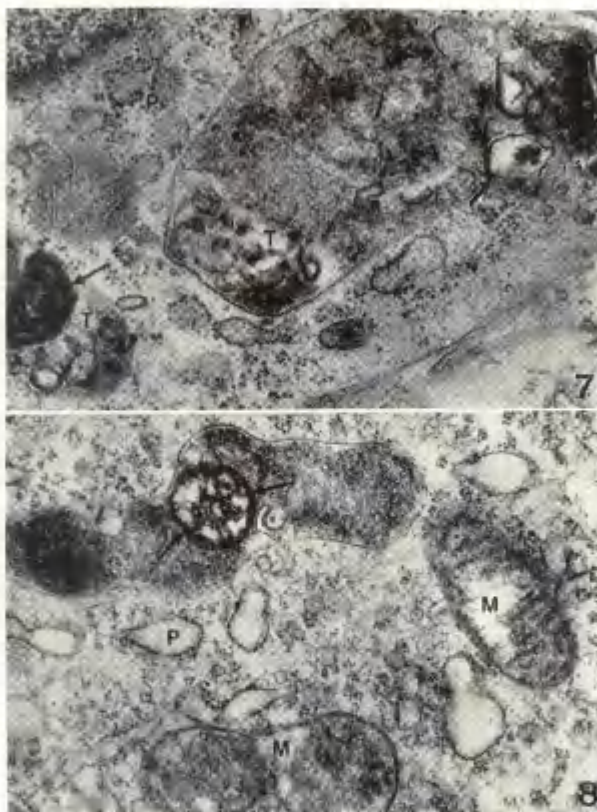


Рис. 7. Участок фибробласта после 3-часового ви-
ального окрашивания нейтральным красным. Укруп-
ненные плотные тельца (Т) содержат миелинные
мембраны (стрелки) ШЭР (Р) фрагментирован на
пузырьки. $\times 35\,000$.

Рис. 8. В плотном тельце наблюдается митохондрия
с признаками частичной деструкции (стрелки). М —
митохондрии; Р — ШЭР. $\times 35\,000$.

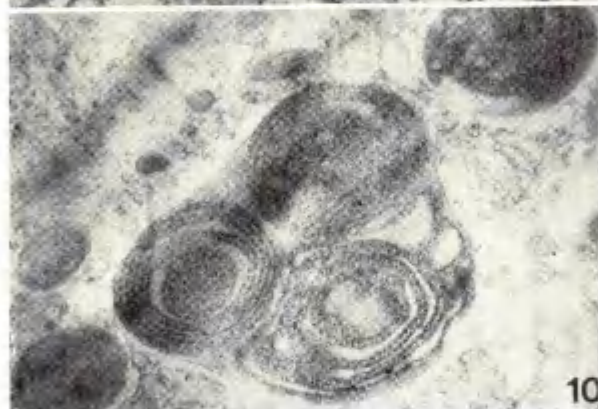
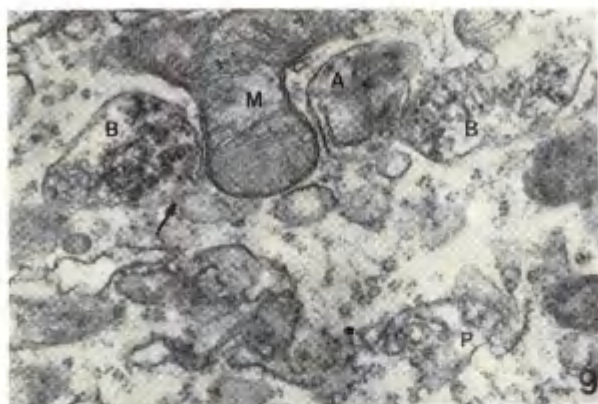


Рис. 9. Скопления зернистого материала в некоторых вакуолях (В). Стрелка указывает на контакт вакуоли с ШЭР (Р). А — аутофагосома; М — митохондрии. $\times 33\,000$.

Рис. 10. Участок витально окрашенного фибробласта в течение 30 минут после перенесения в нормальную питательную среду. Плотное тельце содержит концентрические круги цистерн ШЭР. $\times 35\,000$.

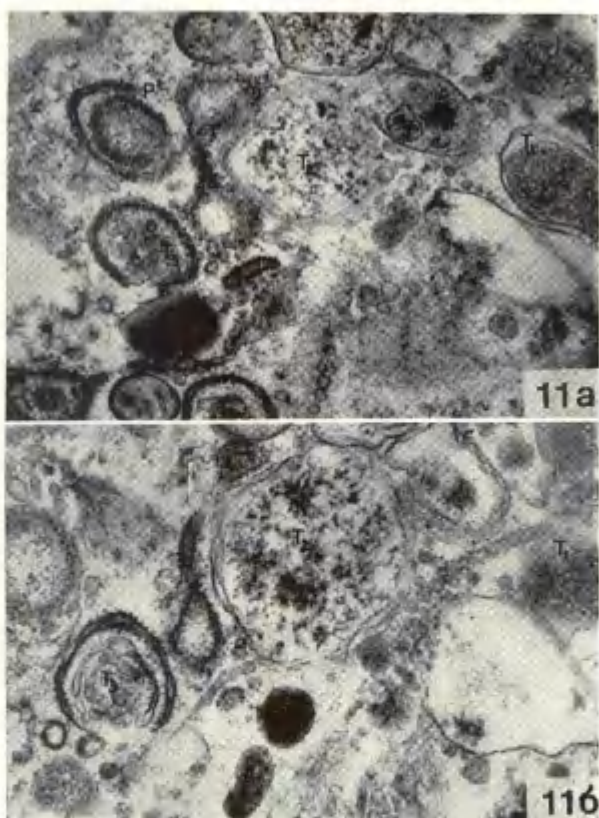


Рис. 11. Параллельные срезы (а, б) из участка цитоплазмы витально окрашенного фибробласта в течение одного часа после перенесения в нормальную среду. В цитоплазме количество цистерн ШЭР (Р) увеличено. Разные формы разложения плотных телец (T_1 , T_2 , T_3). $\times 30\,000$.

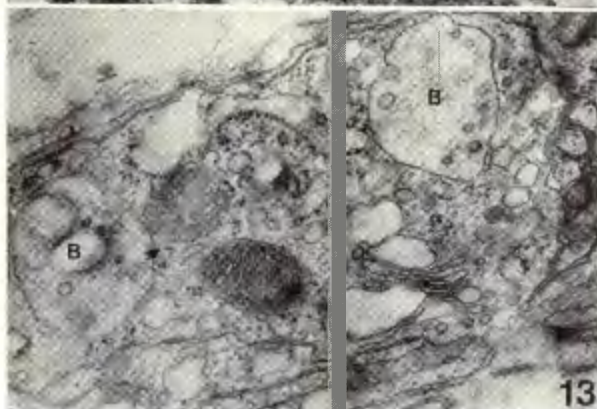
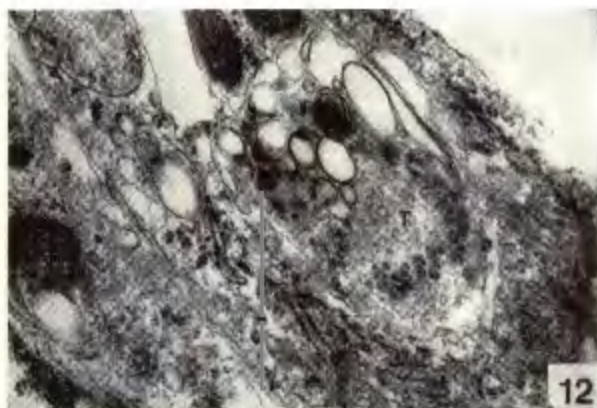


Рис. 12. Плотное тельце (Т) окрашенного фибробласта в течение 30 минут после перенесения в нормальную среду. $\times 33\,000$.

Рис. 13. Аппарат Гольджи окрашенного фибробласта в течение одного часа после перенесения культуры в нормальную питательную среду. $\times 30\,000$.

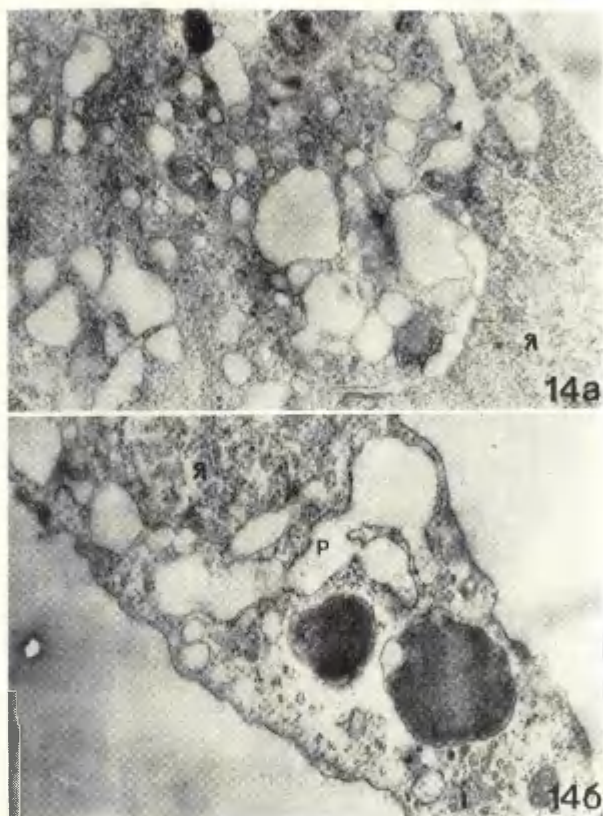


Рис. 14. Перинуклеарное пространство, аппарат Гольджи (рис. 14а) и цистерны ШЭР (Р) (14б) витально окрашенных фибробластов в течение 30 минут после перенесения культуры в нормальную питательную среду. Я — ядро. $\times 30\,000$.

фиксируют в смеси глутаральдегида в четырехкратной осмие /10/. Сверхтонкие срезы изготавливали на ультратоме ЛКВ-III и дополнительно контрастировали ацетатом урана и цитратом свинца /11/. Срезы просматривались в электронных микроскопах УЭМВ-100В и УЭМ-7.

Результаты исследований

Культура нормальных фибробластов 24-48 часов после посева. Самой распространенной формой лизосом являются плотные тельца, связь которых с кислой фосфатазой продемонстрирована в другой работе /12/. Их структура оказывается весьма гетерогенной из-за разного содержания пузырьков в мелкозернистом матриксе (рис. 1, 2). Пузырьки в этих тельцах тоже сильно варьируют по своим размерам и плотности. Плотные тельца вблизи аппарата Гольджи обычно отличаются большей гетерогенностью внутренней структуры (рис. 2), чем эти же образования в более периферийных регионах цитоплазмы. Благодаря переходным формам, родственными частицами плотных телец следует считать светлые вакуоли и аутофагосомы, располагающиеся главным образом вокруг диктиосом (рис. 1, 3, 4). Светлые вакуоли обладают неравномерными контурами, содержат единичные мелкие пузырьки и часто имеют плотную сердцевину. Аутофагосомы окружены двумя мембранами, содержат элементы шероховатой эндоплазматической сети (ШЕР) и некоторые гладкие пузырьки. Плотные тельца, светлые вакуоли и аутофагосомы окружены мелкими пузырьками, которые часто ориентированы рядами как к цистернам ШЕР, так и к диктиосомам. Многие такие пузырьки сходны с теми, которые видны внутри вышеописанных образований. Элементы ШЕР вокруг плотных телец представлены лишь немногочисленными короткими цистернами.

При жизненное окрашивание нейтральным красным. После кратковременного окрашивания (15 минут) гранулы продукта реакции на кислую фосфатазу увеличены в размерах /13/. В это же время наблюдалось и увеличение диффузного распределения энзима. Одновременно ультраструктура фибробластов претерпевает глубокие превращения. Плотные тельца контрольных культур замещены крупными

вакуолями, которые содержат лишь немного плотного вещества и единичные миелоидные фигуры (рис. 5). Такие просветленные тельца окружены длинными цистернами ШЭР с плотным содержанием. Интересно и то, что рядом с этими тельцами наблюдаются небольшие капли жира (0,2-0,4 мкм). Количество дииктисом явно повышено, но они состоят лишь из 2-4 цистерн и окружены немногими пузырьками (рис. 6). Аутофагосомы в этом периоде являются многочисленными компонентами зоны Гольджи.

В течение следующих часов витального окрашивания количество лизосом в фибробластах быстро возрастает /13,14/. После трехчасового опыта плотные тельца вновь превалируют в клетках (рис. 7, 8). По сравнению с контролем они отличаются более крупными размерами, неравномерными контурами и содержат в большем количестве мембран и виде пузырьков, вакуолей и миелоидных фигур. Местами в их матриксе обнаруживаются митохондрии с признаками деструкции (рис. 8). Составной частью некоторых родственных частиц являются скопления рыхлого зернистого материала (рис. 9). Аутофагосомы встречаются редко, но интересно то, что они содержат и митохондрии. ШЭР представлен в виде пузырьков, вакуолей и единичных коротких цистерн. Повреждение митохондрий выявляется в частичном просветлении их матрикса и в нарушении расположения перегородок.

Переживание клеток после прижизненного окрашивания. При перенесении фибробластов после трехчасового витального окрашивания в нормальную питательную среду количество гранул продукта реакции на кислую фосфатазу явно падает в течение следующих часов /13/. Содержимое части плотных телец превращено в концентрические круги цистерн ШЭР уже после 30-минутного опыта (рис. 10). После одночасового пребывания в чистой среде концентрические скопления цистерн ШЭР местами свободно наблюдаются в цитоплазме (рис. 11). Другая часть плотных телец дает основание полагать, что происходит их разложение на гладкие пузырьки разных размеров (рис. 12). Весьма типичным явлением следует считать светлый ободок под внешней мембраной таких телец. Очень часто видны в цитоплазме тельца, окруженные двумя мембранами. В течение первых часов данного опыта аппарат Гольджи гипертрофирован (рис. 13). Среди мно-

гочисленных мелких пузырьков наблюдаются светлые вакуоли, содержащие единичные пузырьки, а также вакуоли с прерванной окружающей мембраной. Перинуклеарное пространство сильно расширено и часто находится в контакте с расширенными диктиосомами (рис. 14). Количество цистерн ШЭР увеличено. Полость, окруженная их мембранами, тоже расширена, а мембраны покрыты рибосомами неравномерно.

Обсуждение

Возможные генетические связи между разными формами лизосом в контрольных культурах были предметом дискуссии в рамках наших предыдущих работ /12,13/. Как вытекает из вышеизложенных данных, морфология лизосом претерпевает в клетках значительные изменения во время витального окрашивания нейтральным красным и при перенесении культур в нормальную среду после окрашивания.

В настоящее время установлен ряд агентов, под влиянием которых можно изменить деятельность лизосом. Так называемые лабильзаторы, как например, витамин А, стрептолизин О и S, ультрафиолетовые лучи и многие другие освобождают в клетках лизосомные энзимы /15,16,17,18/. Считают, что в зависимости от степени повреждения, освобожденные от лизосом энзимы могут вызывать гибель клеток путем аутолиза /19,20/ или весь процесс ограничивается только очаговой деградацией цитоплазмы, от которой клетки "выздоровливают" /21,22/. Лабилизирующим фактором лизосомальных мембран является и нейтральный красный /23/. В пользу этого говорят и наши данные о диффузии кислой фосфатазы /13/ и о просветлении плотных телец в клетках тканевых культур после добавления нейтрального красного в питательную среду. Интересно то, что лабильзация мембран лизосом не вызывает обязательно их деструкцию /24/, как это предполагалось по биохимической концепции лизосом /3,4/.

Диффузия кислой фосфатазы в цитоплазму сопровождается интенсивным возникновением аутофагосом в зоне Гольджи, что, по-видимому, является источником увеличения лизосом в течение первых часов витального окрашивания /14/.

В литературе хорошо известно увеличение количества лизосом в клетках при различных экспериментальных воздействиях.

В это же время их судьба при репарации клеток после временного вмешательства остается неясной. Как и в клетках тканевых культур наших опытов, в гепатоцитах регенерирующей печени количество лизосом падает /25,26,27/. Любопытно подчеркнуть способность клеток в составе целостного организма выбрасывать часть лизосом /27,28/. Но в результатах настоящей работы представляет особый интерес то, что часть плотных телец при репарации клеток превращается в цистерны ШЭР. Мы выдвигаем в качестве рабочей гипотезы предположение, что формирование аутофагосом является в известной мере обратимым процессом. В пользу этого говорит и то, что сегрегированные цистерны ШЭР способны синтезировать белки /29/. Следует подчеркнуть, что количество мембран в цитоплазме увеличивается во время разложения плотных телец. Таким образом, по крайней мере, часть лизосом представляет собой резервный материал для репарации клеток. По литературным данным, наличие лизосомоподобных структур в клетках способствует переживанию клеток в экстремальных условиях, а также быстрое восстановление их структуры /30,31/. И наоборот, регенерация тканей подавлена при стабилизации лизосомальных мембран /32,33/.

Заключение

Эмбриональные фибробласты курицы в условиях тканевых культур (24-48 часов после посева) отличаются обилием лизосом, доминирующей формой которых являются плотные тельца. Добавление к питательной среде нейтрального красного (5 мкг/мл) вызывает просветление этих телец. В течение следующих часов количество лизосом увеличивается за счет интенсивного аутофагоцитоза в зоне Гольджи. При репарации клеток после кратковременного витального окрашивания лизосомы разлагаются или в цистерны ШЭР или в гладкие пузырьки разных размеров. Высказывается гипотеза, что клетки утилизируют материалы, накопленные в лизосомах, а аутофагоцитоз может быть в известной мере обратимым.

Л и т е р а т у р а

1. de Duve, C., Pressman, B.C., Gianetto, R., Wattiaux, R., Appelmans, F. Tissue fractionation studies. 6. Intracellular distribution patterns of enzymes in rat liver tissues. *Biochem. J.* 1955, 60, 604-617.
2. Novikoff, A.B., Beaufay, H., de Duve, C. Electron microscopy of lysosome-rich fractions from rat liver. *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, 1956, 2, 179-183.
3. de Duve, C. Лизосомы - новый тип цитоплазматических частиц. В сб.: Структурные компоненты клетки. М., 1962, 128-172.
4. Novikoff, A.B. Lysosomes in physiology and pathology of cells: contribution of staining methods. In: Ciba Foundation Symposium on Lysosomes, London, 1963, 36-73.
5. Novikoff, A.B., Essner, E., Quintana, N. Golgi apparatus and lysosomes. *Fed. Proc.*, 1964, 23, 5, 1010-1022.
6. de Duve, C., Wattiaux, R. Functions of lysosomes. In: *Annual Rev. Physiol.*, 1966, 28, 435-492.
7. Pfeifer, U. Morphologische und funktionelle Aspekte der cellulären Autophagie. *Acta Morphologica Acad. Sci. Hung.*, 1972, 20, 3-4, 247-267.
8. Кярнер Ю.К. О светомикроскопической организации цитоплазмы фибробластов, растущих в однослойных тканевых культурах. Уч. зап. Тартуского гос. ун-та, 1963, 143, 320-325.
9. Puck, T.T., Marcus, P.Y., Cieciura, S.J. Clonal growth of mammalian cells in vitro. Growth characteristics of colonies from single HeLa cells in vitro with and without a "feeder" layer. *J. Exptl. Med.*, 1956, 103, 273-280.

10. Hirsch, J.G., Fedorko, M.E. Ultrastructure of human leukocytes after simultaneous fixation with glutaraldehyde and osmium tetroxide and "postfixation" in uranyl acetate. *J. Cell Biol.*, 1968, 38, 615-627.
11. Reynolds, E.S. The use of lead citrate at high pH as an electron opaque stain in electron microscopy. *J. Cell Biol.*, 1963, 17, 208-212.
12. Кярнер Ю.К. Связь лизосом с эндоплазматической сетью и с аппаратом Гольджи в фибробластах курицы в трипсинизированной тканевой культуре. *Цитология*, 1971, 13, 10, 1204-1210.
13. Кярнер Ю.К. Идентификация и характеристика лизосом в клетках тканевых культур. Автореф. дисс.канд. наук, Тарту, 1968.
14. Кярнер Ю.К. О лизосомах и витальном окрашивании фибробластов в первичных тканевых культурах. *Арх. анат. гистол. эмбриол.*, 1966, 50, 5, 60-66.
15. Tappel, A.L., Sawant, P.L., Shibko, S. Lysosomes distribution in animals, hydrolytic capacity and other properties. In: Ciba Foundation Symposium on Lysosomes, London, 1963, 78-108.
16. Weissmann, G. Labilization and stabilization of lysosomes. *Fed. Proc.*, 1964, 23, 5, 1038-1044.
17. Keiser, H., Weissmann, G., Bernheimer, A. Studies on lysosomes. *J. Cell Biol.*, 1964, 22, 1, 101-113.
18. Зотиков Л.А., Пинчук В.Г. Некоторые аспекты проблемы лизосом. *Цитология*, 1969, 11, 10, 1205-1219.
19. Lancker, J.L. van, Holtzers, R.L. The release of acid phosphatase and betaglucuronidase from cytoplasmic granules in the early course of autolysis. *Am. J. Path.*, 1959, 35, 3, 563-573.

20. Sawant, P.L., Desai, I.D., Tappel, A.L. Digestive capacity of purified lysosomes. *Biochem. Biophys. Acta*, 1964, 85, 1, 93-102.
21. Hruban, Z., Spargo, R., Swift, H., Wissler, R.W., Kleinfeld, R.G. Focal cytoplasmic degradation. *Amer. J. Pathol.*, 1963, 42, 6, 657-665.
22. Swift, H., Hruban, Z. Focal degradation as a biological process. *Fed. Proc.*, 1964, 23, 5, 1026-1037.
23. Bastos, A.L., Moura Nunes, J.F.B. The effect of lysosome permeability changes on DNA synthesis and mitosis of cells growing in vitro. *Z. Krebsforsch.*, 1967, 69, 1-9.
24. Shibko, S., Pangborn, J., Tappel, A.L. Studies on the release of lysosomal enzymes from kidney lysosomes. *J. Cell Biol.*, 1965, 25, 1-2, 479-485.
25. Jordan, S. Electron microscopy of hepatic regeneration. *Exptl. Molec. Pathol.*, 1964, 3, 3, 183-200.
26. Trotter, N.L. A fine structure study of lipid in mouse liver regenerating after partial hepatectomy. *J. Cell Biol.*, 1964, 21, 2, 233-244.
27. Trotter, N.L. Electron-opaque, lipid-containing bodies in mouse liver at early intervals after partial hepatectomy and sham operation. *J. Cell Biol.*, 1965, 25, 3, 2, 41-52.
28. Brandes, D., Groth, D.P., Guorkey, F. Occurrence of lysosomes in the prostatic epithelium of castrate rats. *Exptl. Cell Res.*, 1962, 28, 1, 61-68.
29. Goldstone, A., Nayyar, R., Hughes, Ch., Koenig, H. A study of the cytogenesis of lysosomes in rat kidney. *J. Cell Biol.*, 1970, 47, 2, 73 A.
30. Nagy, I. Cytosomes as organelles of specific function in nerve cells of invertebrates. In: IX Intern. Congress of Anat., Leningrad, 1970, 92.

31. Ruthmann, A. The fine structure of RNA-storing archaeocytes from gemmules of fresh-water sponges. Quart. J. Micr. Sci., 1965, 106, 1, 99-115.
32. Allison, A.C., Mallucci, L. Lysosomes in dividing cells with special reference to lymphocytes. Lancet, 1964, 7374, 1371-1373.
33. Abraham, R., Hendy, R., Grasso, P. Formation of myeloid bodies in rat liver lysosomes after chloroquine administration. Exptl. Mol. Pathol., 1968, 9, 2, 212-229.

**Fine Structure of Chicken Fibroblast
Lysosomes in Primary Tissue Cultures**

J. Kärner

S u m m a r y

The materials in the present study consisted of chicken fibroblasts grown in "skin-muscle tissue" cultures 24-48 hours after trypsinization. Most of the lysosomes are dense bodies, containing variable number of vesicles, clusters of tiny grains of high density and sometimes whorls of membranes. Various intermediate forms between dense bodies, light vacuoles and autophagosomes can be noted. As early as 15 minutes after neutral red (5 μ g/ml) administration to nutritive media, dense bodies had become sparser and surrounded by endoplasmic reticulum long cisternae. Autophagosomes in close proximity to the Golgi zone had increased in number. Longer (3 hr) neutral red treatment led to a frequent disappearance of the endoplasmic reticulum cisternae. At the same time many dense bodies with complex interior structure could be observed. In another experimental set tissue cultures were removed from dye solution into normal nutritive media. The most striking change by such an experiment is the formation of endoplasmic reticulum cisternae and smooth vesicles in dense bodies. At the same time the amount of membranes in ground cytoplasm shows an appreciable increase in number. It is tempting to speculate that autophagocytosis can be in some degrees reversible and materials segregated in lysosomes can be utilized by cells during their reparation after damage.

О ДВУХ ФОРМАХ ЛОКАЛИЗАЦИИ КРИНОМЫ В КУРИНЫХ КУЛЬТИВИРОВАННЫХ ФИБРОБЛАСТАХ

Ю. Карнер

При длительном витальном окрашивании клеток нейтральным красным глыбки базофильного вещества наблюдаются в цитоплазме после удаления красителя /1/. Хлопин называл совокупность таких гранул криномой и считал их результатом какого-нибудь внутриклеточного секреторного процесса. В составе криномы обнаружены разные вещества /2/, из которых РНК является самой загадочной /3,4,5/. В последнее время появление криномы объясняется или интенсивной аутофагией /6,7,8,9/ или сливанием рибосом в основной цитоплазме /10, 11/. В настоящей работе приводятся данные о локализации криномы при различных концентрациях нейтрального красного.

Материал и методика

Были изучены культуры кожно-мышечной ткани куриных эмбрионов 8-10 суток инкубации. Методика культивации описана ранее /12/. Культуры через 24 часа после посева окрашивались нейтральным красным в концентрации 5 мкг/мл и 20 мкг/мл в течение 24 и 48 часов. Для светомикроскопического исследования культуры фиксировались в смеси Карнуа и окрашивались толуидиновым синим. Переваривание рибонуклеазой проводилось в концентрации 0,5 мг/мл в течение 4-6 часов /13/. Распределение кислой фосфатазы выявлялось по методике Гомори в модификации Гольта /14/.

Для электронномикроскопического изучения культуры фиксировались или по методике Гирша и Федорко /15/ или отдельно в глутаральдегиде и в четырехокиси осмия. Переваривание рибонуклеазой проводилось перед дополнительной фиксацией. Культуры заливались в эпон и ультратонкие срезы изготавливались на ультратоме ЛКБ-8800. Срезы окрашивались ацетатом уранила и цитратом свинца /16/ и просматривались в микроскопе УЭМВ-100 В.

Результаты исследований

Нейтральный красный (5 мкг/мл) откладывается в культивируемых фибробластах в фазотемных гранулах, количество которых после суточного витального окрашивания явно увеличено (рис. I). Эти гранулы располагаются в эндоплазме вокруг ядра и зоны Гольджи, а по своим размерам они не отличаются от тех же гранул неокрашенных клеток (рис. Ia, б). Лишь единичные более крупные гранулы, а иногда и вакуоли встречаются в части клеток. После двухсуточного витального окрашивания фазотемные гранулы укрупнены и увеличено количество вакуолей (рис. Ib). Вакуоли появляются преимущественно вокруг зоны Гольджи, а гранулы обладают в то же время неравномерными контурами.

Высокие концентрации (20 мкг/мл) нейтрального красного в питательной среде вызывают укрупнение большинства окрашенных структур уже после суточного окрашивания (рис. Ir). Многие гранулы из-за сильного преломления света кажутся очень контрастными в микроскопе фазового контраста. Структура крупных гранул и вакуолей является гетерогенной. При дальнейшем окрашивании вакуолизация цитоплазмы увеличивается.

Распределение базофилии в витально окрашенных фибробластах зависит от концентрации красителя. После суточного окрашивания слабой концентрацией нейтрального красного по крайней мере часть фазотемных гранул обладает базофилией (рис. 2а). В пользу этого говорит сходная локализация базофильных зернышек (кринома) и фазотемных гранул и однородное распределение базофилии между зернышками. После двухсуточного прижизненного окрашивания большинство фазотемных гранул содержало базофильные зернышки, которые к этому времени тоже укрупнились (рис. 2б).

Инкубация клеток в более концентрированных растворах красителя (20 мкг/мл) подавляет формирование криномы в цитоплазме. Эндоплазма многих клеток после фиксации становится сотовидной из-за сильной вакуолизации. Немногочисленные базофильные зернышки обнаруживаются между вакуолями (рис. 2в). Часть фибробластов в таких условиях обладает переходными признаками: в участках эндоплазмы с меньшей вакуолизацией фазотемные гранулы связаны с базофилией.

Цитоплазматическая базофилия чувствительна к перевариванию рибонуклеазой. В обработанных препаратах не наблюдается ни гранулярной, ни диффузной базофилии в цитоплазме витально окрашенных клеток (рис. 2г). Интересно отметить, что при длительном прижизненном окрашивании нейтральным красным гранулярное распределение кислой фосфатазы уменьшается, но местами заметно увеличивается диффузное распределение продукта реакции (рис. 3а, б).

Ультраструктура фибробластов контрольных культур описана уже раньше в рамках другой работы /17/. Здесь мы обращаем внимание на те особенности строения клеток, которые, по-видимому, связаны с длительным прижизненным окрашиванием. После суточного окрашивания слабой концентрацией нейтрального красного наблюдается большое количество лизосомоподобных телец, окруженных одной мембраной (рис. 4). Они обладают неравномерными контурами и большой гетерогенностью внутреннего строения. Характерными для таких телец следует считать скопления сверхконтрастного грубозернистого материала. Плотность их матрикса варьирует в больших пределах, но просветление его является общей тенденцией при длительном витальном окрашивании нейтральным красным (5 мкг/мл). Это становится очевидным после двухсуточного опыта (рис. 5). Тельца содержат в варьирующем количестве мембраны в виде пузырьков и миелоидных фигур. Цитоплазматическая сеть представлена как цистернами, так и пузырьками (0,1-0,2 мкм). Такие элементы сети равномерно покрыты рибосомами. Полость, окруженная мембраной, наполнена веществом с умеренной плотностью. Аппарат Гольджи редуцирован до немногих коротких диктиосом, которые окружены малочисленными мелкими пузырьками (рис. 6). Митохондрии мало отличаются от контроля: наблюдается некоторое уплотнение их матрикса и набухание просвета перегородок.

При высоких концентрациях красителя часть лизосомоподобных телец сходны с вышеописанными. Но наряду с этим данный опыт характеризует крупные вакуоли и сверхконтрастные плотные тельца (рис. 7, 8). Цитоплазматическая сеть представлена лишь в виде пузырьков, которые покрыты немногими рибосомами. Местами основная цитоплазма содержит скопления рибосом, которые занимают площадь до 1 мкм (рис. 7). Митохондрии обладают серьезными признаками деструкции: они содержат светлые

зоны без перегородок и часто изменены в такой мере, что их трудно идентифицировать. Жировые капли тоже претерпевают глубокие изменения: имеются разные переходные формы, которые свидетельствуют о превращении их в светлые вакуоли (рис. 8). Некоторые жировые капли встречаются в лизосомоподобных тельцах. Аппарат Гольджи состоит только из пузырьков. После двухсуточного окрашивания высокой концентрацией красителя вакуоли с миелоидными фигурами оказываются превалирующими структурами (рис. 9). Окружающая их мембрана может быть прерывистой. В таких условиях количество зернистого материала между вакуолями увеличено. В цитоплазме обнаруживаются лишь единичные митохондрии.

Как правило, плотность лизосомоподобных телец уменьшается после переваривания препаратов рибонуклеазой или обработки хлорной кислотой. Грубозернистого материала в них не наблюдается (рис. 10). Они содержат миелоидные фигуры, и иногда аморфный матрикс. Рибосомоподобные зернышки отсутствуют в основной цитоплазме, плотность которой после обработки увеличена.

Обсуждение

Меллендорф в своей работе /18/ показал, что образование криномы во время длительного витального окрашивания зависит от концентрации красителя. Локализация криномы совпала с гранулами нейтрального красного только при применении очень слабых концентраций красителя. В это же время базофильная субстанция не была связана с красными вакуолями, возникающими в цитоплазме под влиянием высоких концентраций красителя. Результаты реферируемой работы нашли частичное подтверждение в трудах Зеленина и его сотрудников /10, 11/, т.к. совпадения прижизненно окрашенных структур и базофильных зернышек в фиксированных клетках после применения относительно высоких концентраций акридинового оранжевого (20-30 мкг/мл) установить не удалось. Эти же авторы объясняют появление немногочисленных базофильных зернышек в таких условиях неравномерным распределением рибосом в основной цитоплазме. Как показали и наши наблюдения, это сопровождается глубоким необратимым повреждением клеток, что выражается в

деструкции их мембранных органелл. К сожалению, в работах коллектива Зеленина отсутствуют данные о локализации криномы после длительного витального окрашивания более разбавленными растворами красителя. Результаты наших исследований согласуются с точкой зрения Меллендорфа и в этом отношении. Во-первых, гранулярная базофилия распределяется аналогично фазотемным гранулам в куриных эмбриональных фибробластах тканевой культуры. При этом следует считать доказанным то, что гранулы поздних сроков, накапливающие основные витальные красители, сохраняются после фиксации спиртами /19/. Бесцветных гранул между базофильными зернышками мы не обнаруживали. Во-вторых, плотность округлых телец, эквивалентов фазотемных гранул на уровне ультраструктур, уменьшается после переваривания рибонуклеазой.

Природа гранул нейтрального красного долгое время была объектом дискуссии. По современным представлениям, основные витальные красители (нейтральный красный, акридиновый оранжевый) накапливаются преимущественно в лизосомах /20,21,22,23,24, 25 и др./. Это вытекает из исследований на клетках первичных тканевых культур, которые применялись в данной работе /26,27,28,29/.

Теперь возникает противоречие между отсутствием гранулярного распределения кислой фосфатазы (маркер для лизосом) и идентификацией окрашенных гранул лизосомами после длительного витального окрашивания. Для преодоления этого противоречия окрашенные структуры в рассматриваемых условиях следует классифицировать как группу остаточных телец или постлизосом, которые могут существовать без активности кислых гидролаз /30/.

По мнению некоторых авторов /7,8,9,31,32/, рибонуклеиновая кислота в составе криномы образуется от разложения шероховатой цитоплазматической сети в процессе интенсивной аутофагии, индуцированной основными витальными красителями. Интересно то, что базофильные глыбки по этим исследованиям выявляются в клетках при витальном окрашивании в несколько раз быстрее, чем по нашим данным. Вполне возможно, что механизм воздействия основных красителей в целостном организме отличается от того же в условиях тканевых культур, но объяснение образования криномы в наших опытах только аутофагией не-

правдоподобно. Нам не удалось обнаружить аутофагических вакуолей во время возникновения криномы, хотя такие вакуоли часто встречаются в контрольных культурах /17/. Возможно, интенсивная аутофагия ускоряет возникновение криномы /31/, необходимой предпосылкой которой следует считать наличие основных витальных красителей (нейтральный красный и акридиновый оранжевый). Как известно, эти красители подавляют синтез белков /10,33/. Уменьшение кислой фосфатазы в клетках тканевых культур после длительного витального окрашивания является косвенным доказательством этого. Можно предполагать, что большое количество рибонуклеиновой кислоты в лизосомах выражает патологию их функционирования.

Выводы

1. Интенсивное возникновение криномы наблюдается в куриных культивированных фибробластах лишь после длительного прижизненного окрашивания слабой концентрацией нейтрального красного (5 мкг/мл). Этот процесс подавлен при высоких концентрациях красителя (20 мкг/мл).

2. Кринома обнаруживается при слабых концентрациях красителя в лизосомах, которые обладают светлым матриксом и скоплениями грубозернистого материала.

3. Более высокие концентрации красителя вызывают глубокое повреждение клеток. Скопления рибосом в основной цитоплазме могут быть в таких условиях эквивалентом криномы светомикроскопических препаратов.

Л и т е р а т у р а

1. Chlopin, N.G. Experimentelle Untersuchungen über die sekretorischen Prozesse im Zytoplasma. Arch. exptl. Zellforsch., 1927, 4, 4, 462-599.
2. Stockinger, L. Vitalfärbung und Vitalfluorochromierung tierischer Zellen. Wien. 1964.
3. Kedrowski, B. Über die Eigentümlichkeiten im kolloiden Bau der Embryonalzellen. Z. Zellforsch., 1941, 31, 435-460.

4. Dustin, P. Ribonucleic acid and the vital staining of cytoplasmic vacuoles in animal cells. In: Nucleic acids, Symp. Soc. Exptl. Biol., 1947, 114-126.
5. Schmidt, W. Über Krinomtypen und Krinombildung. Z. Zellforsch., 1958, 47, 713-730.
6. Schmidt, W. Licht- und elektronenmikroskopischen Untersuchungen über die intrazelluläre Verarbeitung von Vitalfarbstoffen. Z. Zellforsch., 1962, 58, 573-637.
7. Kovács, J., Hafiek, B.: The cells of the seminal vesicle and the anterior lobe of prostate as affected by neutral red. Ann. Univ. Sci. Budapest, Sectio Biol., 1966, 8, 141-147.
8. Kovács, J., Peczely, P.: Electron microscopic examination of the effect of neutral red on the epithelial cells of the seminal vesicle of the mouse. Acta biol. Acad. Sci. hung., 1966, 16, 257-283.
9. Kovács, J. Electron microscopic study of crinom formation (cytoplasmic degradation) in the mouse seminal vesicle. Ann. Univ. Sci. Budapest, Sectio Biol., 1969, 11, 43-51.
10. Зеленин А.В. Взаимодействие аминопроизводных акридина с клеткой. М., 1971.
11. Степанова Н.Г., Зеленин А.В. Экспериментально-цитологическое изучение природы криномы. Цитология, 1972, 14, 2, 172-182.
12. Кярнер Ю.К. О светомикроскопической организации цитоплазмы фибробластов, растущих в однослойных тканевых культурах. Уч. зап. Тартуского гос. ун-та, 1963, 143, 320-325.
13. Swift, H. Nucleoprotein localization in electron micrographs. In: The Interpretation of Ultrastructure. New York - London, 1962, 213-232.
14. Holt, S.J. Factors governing the validity of staining methods for enzymes, and their bearing upon the Gomori acid phosphatase technique. Exptl. Cell Res., suppl. 2, 1-27.

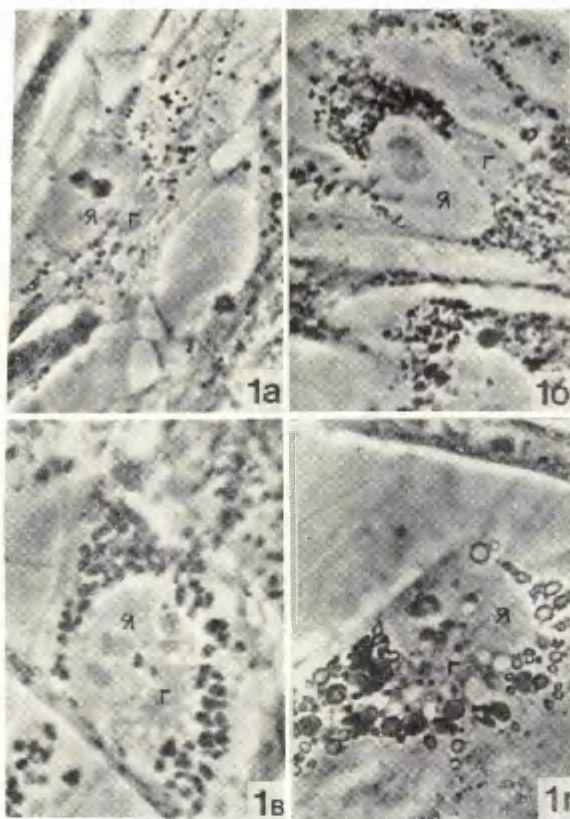


Рис. 1. Живые фибробласты в тканевой культуре до (а) и после (б, в, г) витального окрашивания нейтральным красным. Фазотемные гранулы располагаются вокруг ядра (Я) и зоны Гольджи (Г). а — неокрашенные фибробласты; б — фибробласты после суточного окрашивания слабой концентрацией красителя (5 мкг/мл); в — фибробласты после двухсуточного окрашивания слабой концентрацией красителя (5 мкг/мл); г — фибробласты после суточного окрашивания высокой концентрацией красителя (20 мкг/мл). Микроскоп фазового контраста. $\times 1800$.

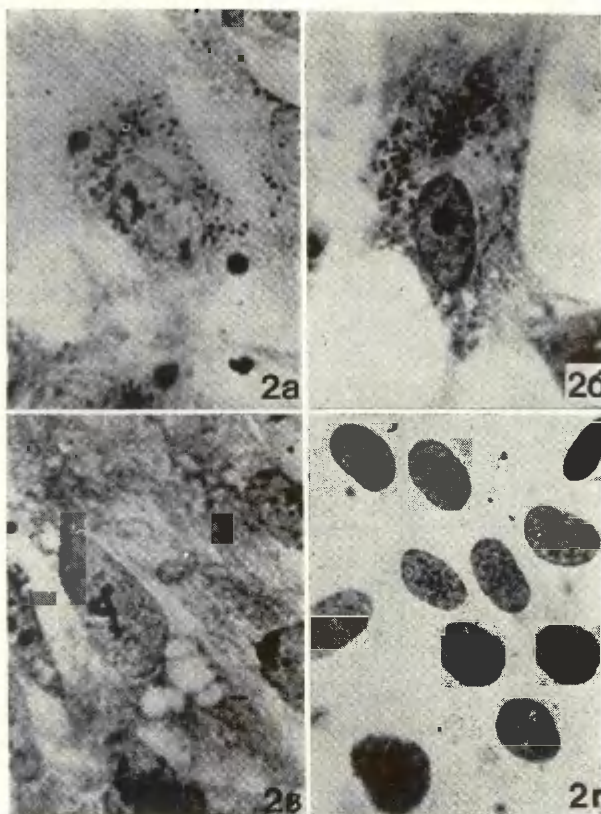


Рис. 2. Распределение в фибробластах базофилии после витального окрашивания нейтральным красным.

а — суточное окрашивание слабой концентрацией красителя (5 мкг/мл); б — двухсуточное окрашивание слабой концентрацией красителя (5 мкг/мл); в — суточное окрашивание высокой концентрацией красителя (20 мкг/мл); г — двухсуточное окрашивание слабой концентрацией красителя (5 мкг/мл), но препарат обработан рибонуклеазой. Карнуа, толудиновый синий. а, б, в — $\times 1800$, г — $\times 1200$.

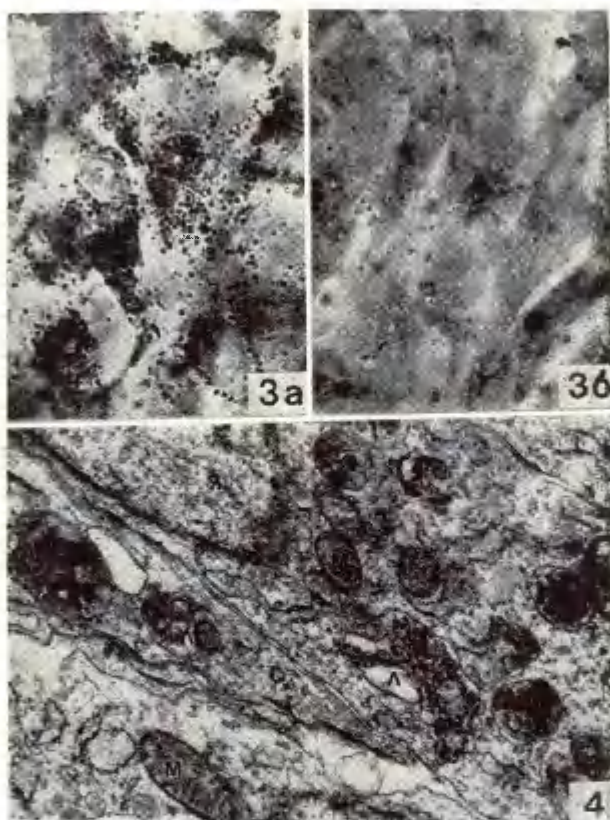


Рис. 3. Распределение кислой фосфатазы в фибробластах до (а) и после длительного (48 часов) витального окрашивания (б) нейтральным красным (5 мкг/мл). Гомори-Гольт. $\times 1200$.

Рис. 4. Участок культуры после суточного витального окрашивания нейтральным красным (5 мкг/мл). Я — ядро; М — митохондрии; Л — лизосомы. $\times 30\,000$.

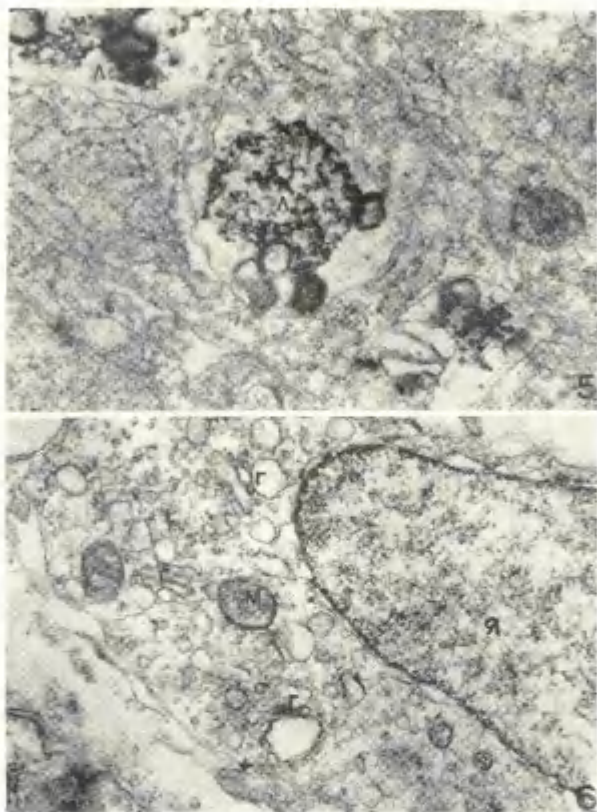


Рис. 5. Участок культуры после двухсуточного окрашивания нейтральным красным (5 мкг/мл). Обозначения те же, что и на рис. 4. $\times 30\ 000$.

Рис. 6. Участок культуры после суточного витального окрашивания нейтральным красным (5 мкг/мл). Г — диктиосомы. Остальные обозначения те же, что и на рис. 4. $\times 30\ 000$.

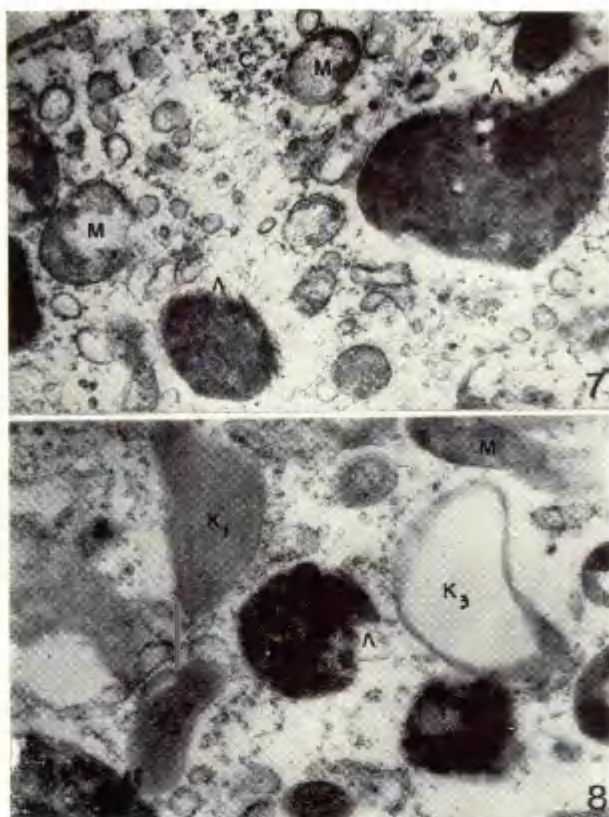


Рис. 7. Участок культуры после суточного витального окрашивания высокой концентрацией нейтрального красного (20 мкг/мл). с — скопление рибосом в основной цитоплазме. Остальные обозначения те же, что и на рис. 4. $\times 30\,000$.

Рис. 8. Участок культуры после суточного витального окрашивания высокой концентрацией нейтрального красного (20 мкг/мл). Разные переходные формы наблюдаются между жировыми каплями и вакуолями (K_1 — K_3). Остальные обозначения те же, что и на рис. 4. $\times 30\,000$.

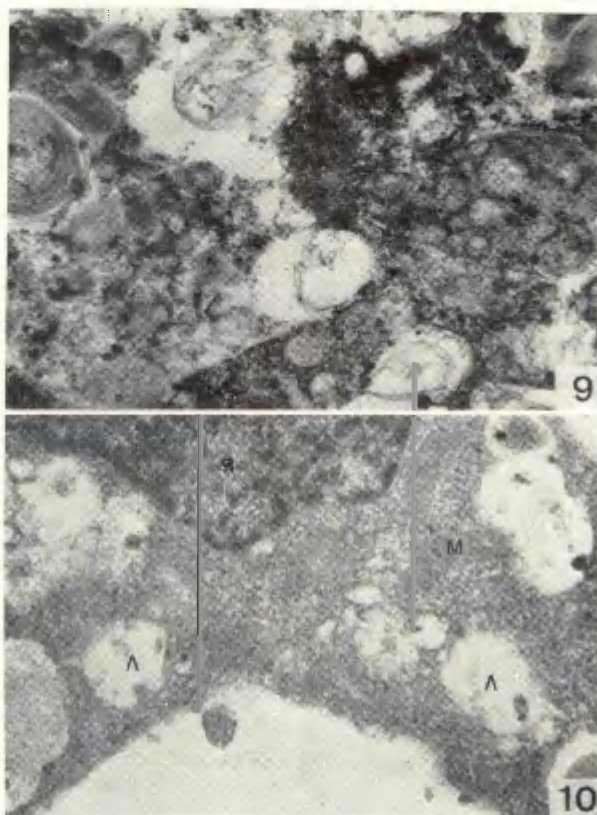


Рис. 9. Сильное повреждение клетки после двух-суточного витального окрашивания высокой концентрацией нейтрального красного (20 мкг/мл). $\times 30\,000$.
 Рис. 10. Участок культуры обработанный рибонуклеазой после суточного витального окрашивания нейтральным красным (5 мкг/мл). Обозначения те же, что и на рис. 4. $\times 30\,000$.

15. Hirsch, J.G., Federko, M.E. Ultrastructure of human leukocytes after simultaneous fixation with glutaraldehyde and osmium tetroxide and "postfixation" in uranyl acetate. *J. Cell Biol.*, 1968, 38, 615-627.
16. Reynolds, E.S. The use of lead citrate at high pH as an electron opaque stain in electron microscopy. *J. Cell Biol.*, 1963, 17, 208-212.
17. Кярнер Ю.К. Связь лизосом с эндоплазматической сетью и о аппаратом Гольджи в фибробластах курицы в трипсинизированной тканевой культуре. *Цитология*, 1971, 13, 10, 1204-1210.
18. von Möllendorff, W. Experimentelle Vakuolenbildung in Fibrozyten der Gewebekultur und deren Färbung durch Neutralrot. *Z. Zellforsch.*, 1936, 23, 746-760.
19. Веселкина М.Н. Образование и фиксация сферических структур в ядерных эритроцитах лягушки при инкубации их в растворах основных красителей и алкалоидов (наблюдение на одиночных клетках). *Цитология*, 1974, 16, 5, 633-637.
20. Pasteels, J.J., Mulnard, J.: Nouvelles recherches sur la signification des inclusions metachromatiques in vivo dans l'oeuf insegmente de la Pholade, *Barnea candida*. *C.r. Acad. Sci. Paris*, 1960, 250, 190-191.
21. Ogawa, K. Cytoplasmic granules of astrocytes cultivated in vitro. *Ann. histochim.*, 1961, 6, 363-369.
22. Koenig, H. Histological distribution of brain gangliosides: lysosomes as glycolipoprotein granules. *Nature*, 1962, 195, 782-784.
23. Koenig, H. Vital staining of lysosomes by acridine orange. *J. Cell Biol.*, 1963, 19, 2, 874.
24. Koenig, H. Intravital staining of lysosomes by basic dyes and metallic ions. *J. Histochem. Cytochem.*, 1963, 11, 1, 120-121.

25. Allison, A.C., Young, M.R. Uptake of dyes by living cells in culture. *Life Sci.*, 1964, 3, 1407-1414.
26. Кярнер Ю.К. О лизосомах и витальном окрашивании фибробластов в первичных тканевых культурах. *Арх. анат. гистол. эмбриол.*, 1966, 50, 5, 60-66.
27. Кярнер Ю.К. Цитологические особенности первичных однослойных тканевых культур. *Уч. зап. Тартуского гос. ун-та, Труды по тканевой биол.*, 1966, I, 4-15.
28. Кярнер Ю.К. Лизосомы в клетках тканевых культур. Тез. УП Всес. съезда анат. гистол. эмбриол., Тбилиси, 1966, 306-307.
29. Kärner, J. Focal degradation of cytoplasm in primary tissue culture cells. IX International Congress of Anat. Leningrad, Abstracts of papers, 1970, 64.
30. de Duve, C., Wattiaux, R. Functions of lysosomes. *Ann. rec. physiol.*, 1966, 28, 435-492.
31. Kovács, J. Focal cytoplasmic degradation and lysosome formation in the epithelial cells of the seminal vesicle of the mouse. *Acta biol. Acad.Sci.hung.*, 1968, 19, 23-33.
32. Rez, G., Kovács, J. Morphological examination of autophagic vacuoles formed in mouse pancreatic exocrine cells under the effect of neutral red. *Ann. Univ. Sci. Budapest, Sectio Biol.*, 1971, 13, 315-326.
33. Zelenin, A.V., Liapunova, E.A. Inhibition of protein synthesis by acridine orange. *Nature*, 1964, 204, 4953, 45.

Crinome in the Chicken Fibroblasts of
Primary Tissue Cultures

J. Kärner

S u m m a r y

Accumulation of basophilic substance (Chlopin's crinome) in neutral red granules observed during our experiment seems to be a striking feature of prolonged vital staining (24 hours) of primary fibroblast cultures with weak neutral red solution (5 g/ml). The basophilic substance is sensitive to the digestion with ribonuclease. During a mere prolonged (48-72 hr) vital staining the amount of ribonucleic acid increases in neutral red granules with a simultaneous marked decrease in their acid phosphatase activity.

On the ultrastructural level the neutral red granules are single membrane limited bodies of varied matrix density containing myeloid figures, vesicles and irregular clusters of grains of high density. The matrix of the bodies becomes sparser during further staining, but the dense aggregates of grains increase in number. Enzyme treatment of cultures prepared for electron microscopy shows that the ribonucleic acid is apparently localized in the granular portion of the membrane-bounded bodies.

At the same time basophilic substance seems to be not connected with the appearance of red vacuoles which arise under the influence of high dye concentration (20 g/ml).

МАКРОФАГИ В ТКАНЕВЫХ КУЛЬТУРАХ СЕЛЕЗЁНКИ И МЯГКИХ МОЗГОВЫХ ОБОЛОЧЕК

А. Пийрсоо

Макрофаги играют важную роль в защитных реакциях организма и их можно обнаруживать в различных органах, в соединительной ткани и в серозных полостях. В связи с тем, что в настоящее время изучение гистогенеза соединительной ткани является одной из важнейших проблем в экспериментальной биологии и медицине, многие работы посвящены изучению макрофагов. Одним из методов изучения макрофагов является метод тканевых культур, который позволяет выяснить гистобластические потенции и детерминацию тканей вне влияния корреляций, имеющих в целостном организме /1/.

Хотя в общем плане макрофаги в условиях тканевых культур изучены довольно хорошо, до сих пор многие вопросы остались нерешенными, в частности происхождение макрофагов в культурах разных тканей, возможность трансформации макрофагов и фибробластов друг в друга, цитохимические свойства макрофагов и др. Для подробного решения этих вопросов мы изучали кусочковые эксплантаты мягких мозговых оболочек головного мозга (30 серий) и селезёнки (10 серий) эмбрионов разных животных (свиньи, крупного рогатого скота, кролика и крысы) и курицы.

Материал и методика

Культуры выращивались на покровных стеклах во флаконах из-под пенициллина. В каждую серию входило в среднем 150-200 кусочковых эксплантатов. Культивирование проводили по опубликованной ранее методике /2/. Культуры исследовались прижизненно в разные сроки и фиксировались в жидкостях Бэкера, Карнуа, Россмана, Хелли, окрашивались гематоксилином - эозином, тионином, суданом черным Б в пропиленгликоле или азур-II-эозином. Активность кислой фосфатазы определялась методом Гомори в модификации Гольта и щелочной фосфатазы - методом Гомори. Дегидрогеназы и цитохромоксидазу определяли на нефиксированном материале: активность сукцинатдегидрогеназы

определялась методом Нахласа и др. /3/, активность гликозо-6-фосфатдегидрогеназы - по Шиффер и Веско /4/ и активность цитохромоксидазы - методом Берстона /5/. Проводилась реакция ШИК; контрольные препараты обрабатывались слюной. Серебрение клеточных границ проводились по классическому методу Ранвье. Нуклеиновые кислоты выявлялись реакцией Фельгена и тионином после обработки рибонуклеазой.

Наблюдение над живыми клетками проводилось при помощи фазоконтрастного устройства микроскопа МБИ-6.

Результаты исследований

С е л е з ё н к а. Первые клетки выселяются из эксплантата уже через несколько часов после культивирования. Это в основном лимфоциты и гранулоциты, которые в последующие дни дегенерируют. Затем на 2-3-й день из центрального куска мигрируют фибробластоподобные клетки, образующие в конце первой недели зону роста вокруг эксплантата (рис. 1). При энергичном выселении и пролиферации фибробластоподобные клетки имеют полигональный или округленный вид. В ходе дальнейшего развития тканевой культуры краевые клетки начинают расплываться, так что в конце недели отмечаются уже более эпителиоидные фибробластоподобные клетки. Интересно отметить, что фибробластоподобные клетки селезёнки свиньи расплываются более интенсивно, чем селезёночные клетки крупного рогатого скота или кролика. Среди фибробластоподобных клеток у всех изученных видов встречаются единичные гигантские клетки обычно с одним большим ядром, которое содержит более 10 ядершек (рис. 2).

Цитоплазма фибробластоподобных клеток окрашивается слабо и не очень четко дифференцируется на эндо- и эктоплазму. Центроплазма или зона Гольджи, около ядра, у большинства клеток обладает меньшей базофилией.

Нейриноидные клетки в культурах селезёнки представлены в виде узких веретенообразных клеток с несколькими длинными отростками (рис. 3). Они растут изолированными колониями между фибробластоподобными клетками или на них.

Характерной формой клеток как в эксплантированном кусочке, так и среди фибробластоподобных клеток являются поли-

бласты Максимова (рис 4). Эти полибласты незначительно варьируются по своим размерам. У них мало цитоплазмы, которая относительно бедна, но обладает высокой базофилией. Они имеют почковидное и овальное, эксцентрично расположенное ядро. Полибласты располагаются на поверхности фибробластоподобных клеток или между ними, они часто образуют клеточные агрегаты, где клетки соединены между собой цитоплазматическими отростками (рис. 4). В клеточных агрегатах полибластов видны митозы (рис. 5). При попадании в культуру инородного тела (например, волокно ваты) полибласты интенсивно скопляются вокруг него (рис. 6).

Необходимо отметить, что полибласты трудно отличать от округленных фибробластоподобных клеток. Явные различия обнаруживаются только после распластывания.

Через несколько дней полибласты начинают распластываться на стекле, в частности в пробелах между фибробластоподобными клетками и на стекле, освободившимся из-под дегенерирующего центрального куска. Распластанные полибласты мы называем макрофагами. Хотя распластывание начинается с первых дней, еще в конце второй недели в культурах наряду с макрофагами мы можем обнаружить агрегаты полибластов.

Фибробластоподобные клетки обычно стягиваются вокруг макрофагов и ретрагируются так, что образуются зоны роста макрофагов (рис. 7). В отдельных случаях распластывание происходит и на поверхности зоны роста фибробластоподобных клеток. В ходе распластывания полибластов, базофилия ядра и цитоплазмы уменьшается. Макрофаги имеют округлое или овальное ядро с несколькими ядрышками. Ядро в клетке занимает эксцентрическое положение. Цитоплазма макрофагов дифференцируется на интенсивно окрашенную эндоплазму и более светлую эктоплазму (рис. 8). Эозинофильная зона эндоплазмы окружена базофильными глыбками, которые перевариваются рибонуклеазой (рис. 9). Эктоплазма представлена одной или несколькими ундулирующими мембранами, края которых окрашиваются гематоксилином. В ходе культивирования в зоне между эндо- и эктоплазмой отмечается вакуолизация, которая особенно сильная у куринных клеток по сравнению с клетками млекопитающих.

Из-за разной степени распластывания макрофаги в культурах селезенки представлены разными формами и их размеры ко-

леблются в значительных пределах. По морфологии клеток можно различать 3 типа макрофагов: круглые, биполярные или гантелеобразные и отростчатые (рис. 8, 10). Между ними имеются переходные формы. Установлено, что плазма на стекле мешает макрофагам распластываться.

Спустя 5-6 дней в культуре начинается образование многоядерных гигантских клеток. Можно различать 2 типа многоядерных клеток: фибробластоподобные многоядерные клетки (рис. 12) и макрофагальные многоядерные клетки или симпласты (рис. 11).

Симпласты образуются путем слияния отдельных макрофагов. В некоторых случаях происходит слияние среди полибластов, находившихся в агрегатах на поверхности фибробластоподобных клеток. В таком случае симпласты не распластываются. Количество ядер в симпласте колеблется от нескольких до 60-70 и, причем отмечается варьирование размеров ядер. В симпласте ядра скоплены в одной или в нескольких группах, рядом с ними находятся эндоплазматические территории (рис. 11).

Как макрофаги, так и симпласты можно различить от фибробластоподобных одно- и многоядерных клеток на основе некоторых свойств. Они образуют разные зоны роста и четко различные по цитохимическим свойствам. Характерным является наличие широкой ундулирующей мембраны и интенсивный фагоцитоз (рис. 13) у макрофагов и симпластов. Край эктоплазмы и зона эндоплазмы у них окрашивается более интенсивно, чем у вторых. Серебрением межклеточных границ установлено, что контакты плазматических мембран имеются только между фибробластоподобными клетками, а макрофаги изолированы друг от друга.

Цитохимические данные показывают, что макрофаги обладают большой активностью кислой, щелочной и тиаминпирофосфатазы, чем фибробластоподобные клетки (рис. 14, 15). Гранулы с активностью фосфатаз макрофагов и симпластов варьируют по величине и расположены в основном в эндоплазме. Следует отметить, что в начале развития культур количество гранул кислой фосфатазы постепенно увеличивается, а в дальнейшем их размеры укрупняются. Их распределение в клетке совпадает с фазогемными гранулами живых клеток.

Активность кислой фосфатазы у симпластов наблюдается и вблизи плазматической оболочки. Как правило, слюннорезистент-

ные ШИК-положительные гранулы макрофагов обнаруживаются в эндоплазме и их больше, чем у фибробластоподобных клеток. Важно отметить, что полибласты в реакциях на фосфатаз и ШИК окрашиваются так интенсивно, что гранулярного распределения реакционного продукта не наблюдается.

Активность гликозо-6-фосфатдегидрогеназы, лактатдегидрогеназы, сукцинатдегидрогеназы и цитохромоксидазы в клетках макрофагов и симпластов выше, чем в других типах клеток (рис. 16). Липиды в виде гранул различного размера располагаются в зонах между эндо- и эктоплазмой (рис. 17). В культурах селезенки часто наблюдается периполез лимфоцитов на поверхности макрофагов. При этом между лимфоцитами и макрофагами отмечаются цитоплазматические мостики. Такие же соединения бывают и между двумя макрофагами, реже - между макрофагом и фибробластоподобной клеткой.

Мягкие мозговые оболочки головного мозга. Общая характеристика культуры мягких мозговых оболочек дана в работе К.И. Пыльдвере /6/ и поэтому в данной работе мы ограничиваемся лишь рассмотрением клеток макрофагального ряда.

Уже в первые дни после культивирования из центрального куска в зону роста мигрируют отростчатые клетки и клетки с псевдоподиями (рис. 18). Они являются мигрирующими формами тканевых макрофагов мягких мозговых оболочек. На свободной поверхности стекла или в пробелах между фибробластоподобными клетками эти формы распластываются. Если в центральном куске имеются макрофаги в большом количестве (эмбрионы более старшего возраста), миграция макрофагов и фибробластоподобных клеток происходит из противоположных сторон эксплантата. В начале культивирования сильно базофильные клетки с высоким содержанием гидролитических энзимов наблюдаются в центральном куске вблизи сосудистого эндотелиального покрова. Эти перипитоподобные клетки (рис. 19) затем мигрируют в зону роста и превращаются в типичные макрофаги.

Полибласты происходящие из крови являются третьим клеточным типом в культуре мягких мозговых оболочек.

Макрофаги мягких мозговых оболочек не отличаются от макрофагов селезенки по своей морфологии и по цитохимическим данным.

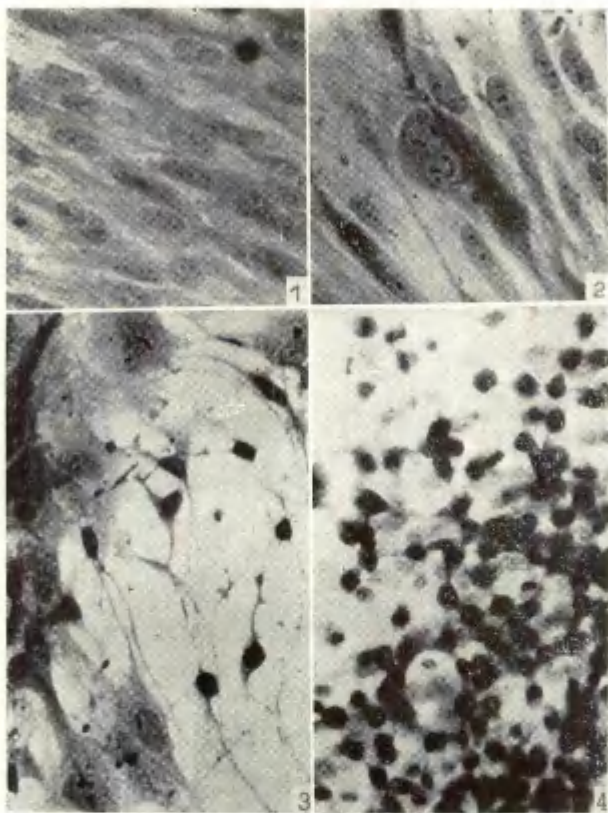


Рис. 1. Фибробластоподобные клетки вокруг эксплантата. Селезёнка. Гематоксилин — эозин. $\times 490$.

Рис. 2. Гигантская фибробластоподобная клетка. Селезёнка. Гематоксилин — эозин. $\times 490$.

Рис. 3. Нейриноидные клетки в пробеле между фибробластоподобными клетками. Селезёнка. Гематоксилин — эозин. $\times 493$.

Рис. 4. Полибласты соединены между собой цитоплазматическими отростками. Селезёнка. Гематоксилин — эозин. $\times 490$.

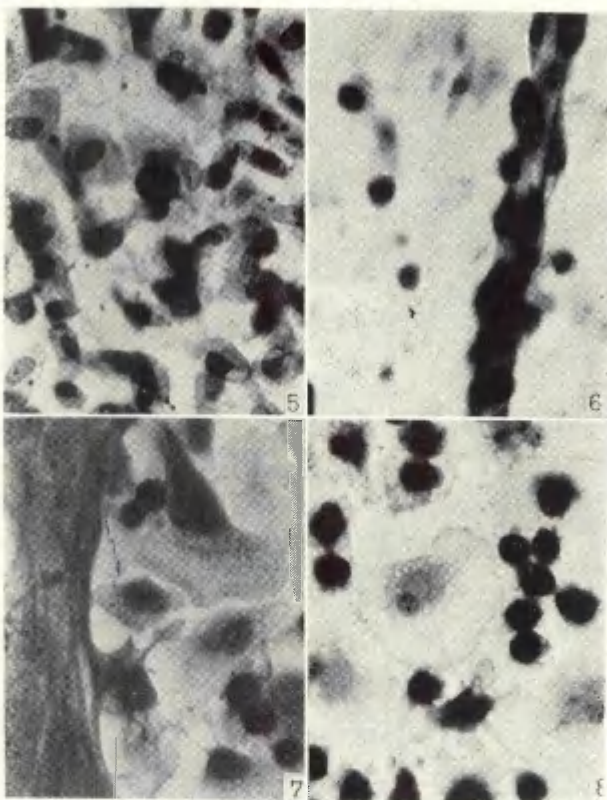


Рис. 5. Митоз полибласта. Селезёнка. Гематоксилин — эозин. $\times 490$.

Рис. 6. Полибласты скоплены вокруг волокна ваты. Селезёнка. Гематоксилин — эозин. $\times 490$.

Рис. 7. Ретрагирующие фибробластоподобные клетки вокруг зоны макрофагов. Селезёнка. Гематоксилин — эозин. $\times 490$.

Рис. 8. Макрофаги в разных степенях расплывания. Селезёнка. Гематоксилин — эозин. $\times 490$.

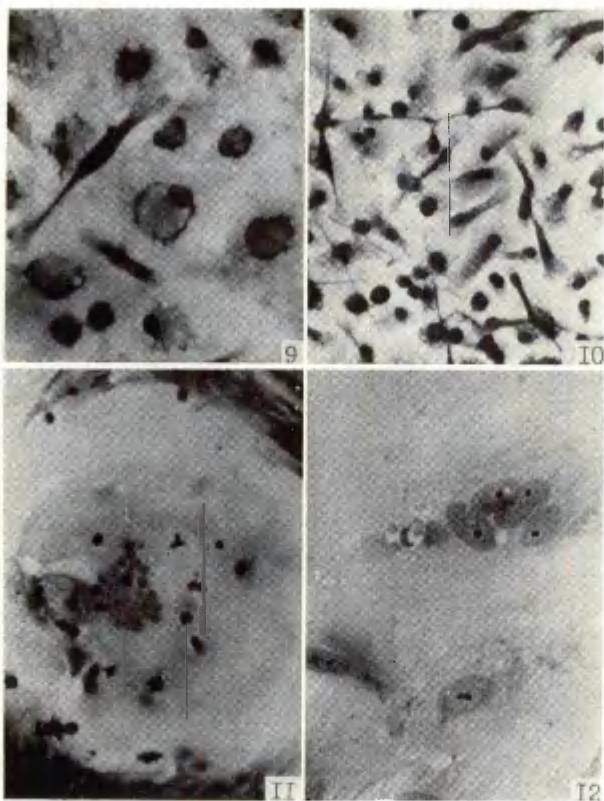


Рис. 9. Базофильные глыбки вокруг эндоплазмы макрофагов. Селезёнка. Тинии. $\times 490$.

Рис. 10. Формы макрофагов. Биполярные клетки. Селезёнка. Гематоксилин — эозин. $\times 215$.

Рис. 11. Макрофагальная многоядерная клетка. Селезёнка. Гематоксилин — эозин. $\times 215$.

Рис. 12. Фибробластоподобная многоядерная клетка. Селезёнка. Гематоксилин — эозин. $\times 490$.

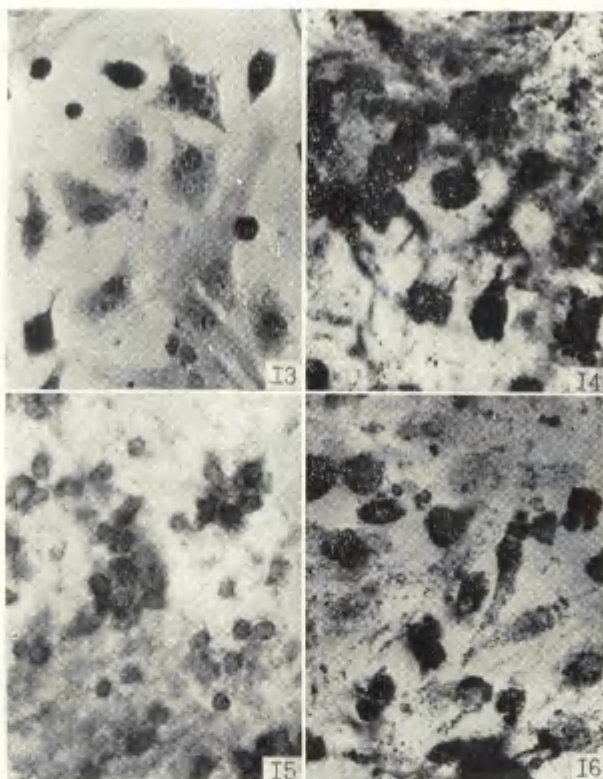


Рис. 13. Макрофаги в фагоцитированном материале. Селезёнка. Гематоксилин — эозин. $\times 490$.

Рис. 14. Активность кислой фосфатазы. Селезёнка. Метод Гомори в модификации Гольта. $\times 490$.

Рис. 15. Активность щелочной фосфатазы. Селезёнка. Метод Гомори. $\times 215$.

Рис. 16. Активность гликозо-6-фосфатдегидрогеназы. Селезёнка. Метод Шиффера и Веско. $\times 490$.



Рис. 17. Липидные гранулы в цитоплазме макрофагов. Селезенка. Судан черный Б в пропиленгликоле. $\times 490$.

Рис. 18. Отростчатые макрофаги с активностью кислой фосфатазы. Мягкие мозговые оболочки. Метод Гомори в модификации Гольта. $\times 490$.

Рис. 19. Перицитоподобная клетка вблизи эндотелиального покрова. Мягкие мозговые оболочки. Гематоксилин-эозин. $\times 1470$.

Обсуждение

Макрофаги встречаются почти во всех тканевых культурах. По мнению многих авторов /7-10/, макрофаги образуются из моноцитов крови. Но эту точку зрения нельзя считать общепризнанной /11-13/. Некоторые авторы /14-16/ считают возможным источником макрофагов в мягких мозговых оболочках, с одной стороны, недифференцированные клетки мягких мозговых оболочек, с другой стороны - клетки, которые происходят из крови.

По нашим данным полибласты в тканевых культурах морфологически являются или типичными моноцитами или их предшественниками. Это подтверждается многими признаками, как например почковидное или овальное эксцентричное ядро, узкая полоса цитоплазмы и большое сродство к основным красителям. Полибласты в культурах селезенки представляют собой, по-видимому, промоноциты, которые способны к митотическому делению. Наличие промоноцитов в селезенке зародыша объясняется происходящим там кроветворением. А полибласты в культурах мягких мозговых оболочек, по всей видимости, представляют собой моноциты вышедшие из кровяных капилляров. По нашему мнению, полибласты оказываются одним из источников макрофагов в тканевой культуре. Переход собственных клеток мягких мозговых оболочек в макрофаги нами не наблюдался.

Менее ясным остается вопрос о сущности перицитоподобных клеток в наших опытах. По своей топографии их можно считать перицитами, переход которых в макрофаги неоднократно показан в литературе /17, 18/. С другой стороны, их сходство с моноцитами заставляет считать их лишь переходными клетками на пути от кровяного русла к оседлым макрофагам мягких мозговых оболочек. С последней точкой зрения резонируют и данные Т. Китамура /19/, который изучал происхождение макрофагов головного мозга.

В тканевых культурах макрофаги отличаются степенью распластывания. Это объясняется как физическими (отсутствие или недостаток свободной от клеток поверхности стекла, движение соседних клеток и т.д.), так и химическими факторами. Как известно, распластывание клеток зависит от концентрации разных ионов, от pH среды и т.д. /20, 21/.

По литературным данным слияние макрофагов в симпласты вызвано экспериментально разными факторами: антисывороткой макрофагов /22,23/, вирусом Сендай /24/ и т.д. В наших культурах превращение макрофагов в симпласты происходит в нормальных условиях. Небезынтересно, что плазматические оболочки сливающихся клеток приобретают активность кислой фосфатазы, что указывает на роль лизосом в слиянии макрофагов /24/.

Обычным явлением в тканевых культурах считается образование межклеточных мостиков. Цитоплазматические соединения встречаются, как правило, между двумя макрофагами или между лимфоцитом и макрофагом (периподез), реже — между макрофагом и фибробластоподобной клеткой. Значение подобных контактов неясно. Авторадиографические исследования показали, что через такие соединения происходит обмен веществ /25/, в том числе и РНК /26, 27/, между клетками.

Заключение

Макрофаги в двух изученных источниках являются весьма сходными (цистохимические свойства, образование симпластов, периподез и т.д.). Высокая активность как гидролитических энзимов, так и многих других показывают различие между макрофагами по сравнению с фибробластоподобными клетками. Макрофаги и фибробластоподобные клетки представлены двумя самостоятельными популяциями клеток, которые характеризуются изолированностью зон роста.

Установленные в литературе *in vivo* различия по цистохимическим свойствам между макрофагами и другими клеточными типами сохраняются и в условиях тканевых культур. Таким образом, специфичность макрофагов сохраняется в условиях тканевых культур несмотря на их генезис.

Л и т е р а т у р а

1. Пыльдвере К.И. О некоторых проблемах тканевой биологии в однослойных культурах. Труды по тканевой биологии I. Уч. зап. Тартуского гос. ун-та, 1966, 189, 218-223.

2. Пыльдверс К.И. Рост и превращение эмбриональной эпандимы в тканевых культурах. Арх. анат., 1969, 57, 58-67.
3. Nachlas, M.M., Kwang-Chung Tsou, de Sousa, E., Chao-Shing Cheng, Seligman, A.M. Cytochemical demonstration of succinic dehydrogenase by the use of a new nitro-phenyl substituted ditetrazole. J. Histochem. a. Cytochem., 1957, 5, 420-428.
4. Schiffer, D., Vesco, C. Histochemical observations about pattern of tetrazolium reduction with different substrates in glia cells of normal and pathological human nervous tissue. J. Histochem. a. Cytochem., 1963, 11, 335-342.
5. Беротон М. Гистохимия ферментов. М., 1965.
6. Пыльдверс К.И. Рост и превращение менинготелия в тканевой культуре. Арх анат., 1972, 62, II-19.
7. Furth, R., Thompson, J. Review of the origin and kinetics of the promonocytes, monocytes and macrophages and a brief discussion of the mononuclear phagocytes. Ann. Inst. Pasteur., 1971, 120, 337-355.
8. Nichols, B.A., Bainton, D.F., Farquhar, M.G. Differentiation of monocytes origin, nature and fate of their azurophil granules. J. Cell Biol., 1971, 50, 498-515.
9. Leder, L.D. The origin of blood monocytes and macrophages. A review. Blut., 1967, 16, 68-98.
10. Volkman, A., A current perspective of monocytopenesis. Curr. Top. Pathol., 1971, 54, 76-94.
11. Fischer, A. Umwandlung von Fibroblasten zu Makrophagen in vitro. Arch. f. exp. Zellforsch., 1927, 3, 345-352.
12. Carr, J. The reticulum cell and the reticular cell in the mouse popliteal lymph node. An electron microscopic autoradiographic study. Virchows Arch. Abt. B. Zellpath., 1973, 15, 1-10.

13. Suzuki, Y., Churg, J., Ono, T. Phagocytic activity of the mouse popliteal lymph node. An electron microscopic autoradiographic study. *Virchows Arch. Abt.B. Zellpath.*, 1973, 15, 1-10.
14. Morse, D. Low, F.N. The fine structure of subarachnoid macrophages in the rat. *Anat. Rec.*, 1972, 174, 469-476.
15. Morse, D.E., Low, F.N. The fine structure of the pia mater of the rat., *Am. J. Anat.* 1972, 133, 349-368.
16. Frederickson, R.G., Haller, F.R. The subarachnoid space interpreted as a special portion of the connective tissue space., *Proc. North Dakota Acad. Sci.*, 1971, 24, 142-159.
17. Maxwell, D.S., Kruger, L. Small blood vessels and the origin of phagocytes in the rat cerebral cortex following heavy particle irradiation., *Exptl. Neurol.*, 1965, 12, 33-54.
18. Mori, S., Leblond, G.P. Identification of microglia in light and electron microscopy., *J. Comp. Neurol.*, 1969, 135, 57-80.
19. Kitamura, T. The origin of brain macrophages - some considerations on the microglia theory of Del Rio-Hortega., *Acta Path. Jap.* 1973, 21, 11-26.
20. Rabinovitch, M., De Stefano, M.J. Macrophage spreading in vitro. *Exptl. Cell Res.*, 1973, 77, 323-334.
21. Rabinovitch, M., De Stefano, M.J. Macrophage spreading in vitro. Manganese and other metals as inducers: or as co-factors for induced spreading., *Exptl. Cell Res.*, 1973, 79, 423-430.
22. Ptak, W., Porwit-Bobr, Z., Chlap, Z. Transformation of hamster macrophages into giant cells with antimacrophage serum., *Nature*, 1970, 225, 655-657.
23. Ptak, W., Cichocki, T. The mechanism of antimacrophage serum - induced fusion of hamster macrophages., *Acta histochem.*, 1972, 44, 116-121.

24. Harris, H. Behaviour of differentiated nuclei in heterokaryons of animal cells from different species. *Nature*, 1965, 206, 583-588.
25. Katsuta, H., Takaoka, T. Rat thymus cells in culture. II Reticulum cells and globulins. *Jap. J. Exptl. Med.*, 1973, 43, 263-271.
26. Yokomura, K., Nozima, T. Bridge formation between mouse peritoneal macrophage-macrophage and macrophage-lymph node cells and the influence of various chemicals. *J. Histochem. Soc.*, 1972, 11, 579-598.
27. Aronson, M. Bridge formation and cytoplasmic flow between phagocytic cells. *J. exp. Med.*, 1963, 118, 183-189.

Macrophages in Tissue Cultures of Spleen and Leptomeninges

A. Piirsoo

S u m m a r y

Some characteristics and development of macrophages of spleen and leptemeninges cultures of several animals (pig, cow, rabbit, rat) and chick embryos were studied by ordinary cytological and histochemical methods. High level of cytoplasmic phosphatases and oxidative enzymes, enhanced phagocytic activity and extended cytoplasmic processes or undulating membranes were characteristic for macrophages from both these sources. Multinucleated giant cells appeared in tissue cultures after 5 - 6 days of cultivation. Presumably they arose from the fusion of macrophages.

We suppose, our observations indicate that macrophages in tissue cultures of spleen originate from polyblasts and in tissue cultures of leptemeninges from resting macrophages of leptemeninges, from podocyte-like cells or from polyblasts.

О ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ К АКРИФЛАВИНУ R^+ И R^- ШТАММОВ БАКТЕРИЙ И ЭЛИМИНАЦИЯ R-ФАКТОРОВ

А. Хейнару, Т. Илус

Элиминация наследственных детерминантов, связанных с эписомой (или плазмидой), может происходить как спонтанно, так и под влиянием многих агентов /1/. При теоретических исследованиях в качестве элиминирующих агентов наиболее широко используются акридиновые красители /2-6/.

Данные об элиминирующем действии акридиновых красителей на культуру энтеробактерий с факторами трансмиссивной резистентности к лекарственным веществам (R-факторы) приводятся в работах многих авторов /7-10/. При этом молекулярные механизмы элиминации эписомных элементов под влиянием акридиновых красителей остаются во многом еще неясными. Элиминацию R-факторов связывают с их автономными (внехромосомными) состоянием /5,7/, изменениями в структуре плазматической мембраны клетки /11-12/, влиянием цитоплазматического репрессора, детерминированного R-факторами /10/, повышением мутабельности клетки /13/ и различиями в скорости роста R^- и R^+ клеток /14/. Наличие R-фактора придает клеткам чувствительность к акридинам, вследствие чего селективируются R^- клетки /15-16/. Известны и противоположные наблюдения об отсутствии элиминируемости у всех /17/ или некоторых R-факторов /18-19/.

С другой стороны, известно, что гены чувствительности (асг А) и резистентности (асг А⁺) к акрифлавину находятся не на эписоме, а на бактериальной хромосоме вблизи lac-локуса /20/.

Исходя из вышеизложенного, задачей настоящей работы являлось изучение чувствительности к акрифлавину различных R^+ и R^- штаммов *Escherichia coli* и элиминации R-факторов под влиянием акрифлавина.

Материал и методика

Среды. Использовали мясо-пептонный бульон (МПБ) Хоттингера, pH 7,4, и плотные питательные среды - 0,5 и 1,5% мясо-пептонный агар (МПА), среда Эндо и минимальный агар Дэвиса и Мингиоли /21/. Антибиотики хлорамфеникол и тетрациклин добавляли к средам в концентрации 25 мкг/мл, стрептомицин в концентрации 15 и 200 мкг/мл, неомицин - 20 мкг/мл и бензилпенициллин - 1000 ЕД/мл. Определение чувствительности к неомицину проводилось в бессолевом МПА /22/. Применяли препарат акрифлавина В.Р.С. (British Drug Houses Ltd).

Штаммы. В работе использовали 464 R⁺ рекомбината штамма *E. coli* K12, несущие 224 различных по происхождению R-фактора /23/. Краткая характеристика этих штаммов приведена в табл. I. Кроме названных, использовали и следующие штаммы

Т а б л и ц а I

Характеристика штаммов-рекомбинантов *E. coli* K12 R⁺
по типу R-фактора в скрещиваниях

Sh. sonnei x *E. coli* K12

R ⁺ Sh. sonnei	Число доноров	Колицино- генность*	Число R ⁺ реком- бинантов**	Из них колицино- генные	Тип R-фактора***
I74	+	52 I21	373	8	Sm.Cm.Tc
29	+	13 I6	56	5	Cm
II	+	11 0	20	0	Sm.Cm.Tc.Pn
5	+	1 4	6	1	Cm.Pn
5	+	3 2	5	2	Sm.Cm
I	+	0 1	1	0	Cm.Tc

* + колициногенные; - неколициногенные.

** Из каждого скрещивания изолировали обычно 2 рекомбинанта, только в некоторых случаях 1 или 4 рекомбинанта

*** Гены резистентности к стрептомицину (Sm), хлорамфениколу (Cm), тетрациклину (Tc) и бензилпенициллину (Pn).

бактерий, изолированные нами ранее /24-27/: варианты штамма *E. coli* K12 W1485 F⁻ - R3ColE2+ColIb, R3ColE1+ColE2+ColIb, R2Col⁻, R2ColE1, R2ColE1, R12Col⁻, R37Col⁻, R25Col⁻, R26ColA+ColE1, штамма *E. coli* K12 P678 F⁻ - R3ColE2+ColIb, R3ColE1+ColE2+ColIb, R2ColE1, R2Col⁻, R25Col⁻, R26ColA+ColE1, штамма *E. coli* K12 W1655 F⁺ - R2ColE1, R26ColA+ColE1 и дикого штамма *E. coli* 32 - R38ColE1+ColA+ColIb, R⁻ColE1+ColA+ColIb, R38Col⁻ и R⁻Col⁻. В процессе конъюгации реципиентами служили стандартные штаммы *E. coli* K12: K12 (прототроф), W3876 F⁻ afa₃str-r, W1485 F⁻met⁻, P678 F⁻thr⁻leu⁻B1⁻str-r, прототрофные штаммы *E. coli* HfrH и *E. coli* OIII, полученные с кафедры микробиологии Тартуского госуниверситета К.М.Н. В. Таллмейстер, а также 16 стандартных колициногенных штаммов Фредерика. Для контроля применялся стандартный донорский штамм Ватанабе *E. coli* K12 CSH2-R222(Sm.Cm.Tc.Sa)fi⁺. В качестве штаммов-индикаторов для определения колициногенности использовались штаммы *E. coli* K128 и P678.

Лекарственные вещества. Использовались советские препараты: стрептомицин сульфат, кристаллическая натриевая соль пенициллина, тетрациклин гидрохлорид, неомицин сульфат и хлорамфеникол.

Методы. Колициногенность и чувствительность в колицинам определялись по общепринятой методике /28/.

Для проверки чувствительности к лекарственным веществам бульонные культуры исследуемых бактерий со средним содержанием 5×10^8 микробных тел в 1 мл разбавляли до 10^{-4} физиологическим раствором и засеивали 1 стандартную петлю на МПА с содержанием лекарственных веществ в различной концентрации /24-25/.

Для передачи R- и Col-факторов в процессе конъюгации применяли использованную нами ранее методику /24-27/. Селекцию рекомбинантов проводили на среде с добавлением 25 мкг/мл хлорамфеникола или тетрациклина. Если бактерии-доноры были ауксотрофные и бактерии-реципиенты прототрофные, использовали минимальную среду, в других случаях - среду Эндо. В последнем случае бактерии-доноры и -реципиенты различались по способности спрашивать лактозу. Для выяснения совместной пе-

редачки R-и Col-факторов в случае применения R⁺Col⁺ бактери-доноров у изолированных рекомбинантов определяли способность продуцировать колицин.

Для определения устойчивости штаммов бактерий к акрифла-вину применяли два метода. Первый, метод серийных разведе-ний, был аналогичный методу проверки чувствительности к ле-карственным веществам. При этом использовали пластинки I,5% МПА с добавлением 100, 200, 300 и 400 мкг/мл акрифлавина. Выяснилось, что этот метод имеет ряд недостатков, поэтому мы разработали второй метод - метод градиента концентраций ак-рифлавина. Для этого приготовили пластинки, концентрация ак-рифлавина в которых колебалась от 0 до 200 или 400 мкг/мл. Во избежание ошибок пытались изготовить все пластинки абсо-лютно идентично. В опытах применялись чашки Петри одного и того же типа.

Одну пластинку засеивали штрихом, начиная от нулевой кон-центрации акрифлавина, одну стандартную петлю - 4-6-часовой бульонной культурой 10-12 изученных штаммов бактерий. После 24-часовой инкубации при 37° определяли относительные резис-тентности изученных штаммов бактерий. Для этого на пластинке на расстоянии 2,5 см от нулевой стороны концентрации акри-флавина мы отмечали перпендикулярную линию, по отношению к которой определяли рост изученных микробов. Этот метод дал удовлетворительные результаты для оценки относительной ре-зистентности различных штаммов бактерий к акрифлавино.

Элиминацию R-факторов акрифлавином проводили следующим методом. Изученные штаммы бактерий засеивали на пластинке I,5%МПА с добавлением антибиотиков стрептомицина, тетрацик-лина или хлорамфеникола в концентрации 25 мкг/мл. Из вырос-ших колоний сделали пересевы в МПБ и инкубировали 4-6 часов при 37°. Из суспензий исследуемые бактерии засеивали в бульон (рН 7,6) с добавлением акрифлавина (20 мкг/мл). После суточ-ной инкубации в термостате при 37° разные объемы культуры высевали на чашки с I,5%-ным мясо-пептонным агаром. Пластин-ки с выросшими на агаре колониями (не превышающими 70-100) использовали для пересева методом реплик /29/ на МПА с анти-биотиками (стрептомицин, тетрациклин или хлорамфеникол в концентрации 25 мкг/мл) и без них. После суточной инкубации чашек в термостате при 37° подсчитывали количество выросших

колоний. Колонии микробов с элиминированными R-факторами изолировали, проверяли их биохимические свойства, количественность и чувствительность к антибиотикам.

С целью выяснения эффекта длительного воздействия акрифлавина на частоту элиминации R-факторов, изученные культуры пассировались 10 раз в течение 10 дней в бульоне с добавлением акрифлавина в концентрации 20 мкг/мл. Все пересевы делали стандартной петлей в 5 мл свежий бульон. После десятого пассажа вышеизложенным методом определяли частоту элиминации R-факторов и чувствительность штаммов к акрифлави-ну.

Результаты исследований

При определении резистентности штаммов бактерий к акрифлави-ну по методу серийных разведений выяснилось, что этот метод имеет ряд недостатков, вследствие чего отдельные серии опыта не давали совсем одинаковых результатов. Так, в некоторых случаях акрифлавин действовал как бы сильнее. Это, видимо, обусловлено несколькими причинами. Все же путем использования в одной серии приготовленных сред в опытах были получены удовлетворительные результаты.

В первой серии опытов сравнивались между собой чувствительность к акрифлави-ну штамма-реципиента *E. coli* K12 и 464 штамма-рекомбинанта, несущие 224 различных по происхождению R-фактора (табл. 2). Выяснилось, что 83% из R⁺ рекомбинантных штаммов имели более высокую резистентность к акрифлави-ну, чем реципиентный штамм *E. coli* K12. Из них 103 рекомбинантных штамма (22,2%) были высокорезистентные. Итак, эти данные показывают, что по крайней мере некоторые R-факторы определяют резистентность к акрифлави-ну.

В литературе имеется много данных, согласно которым Col-факторы не элиминируются под действием акридиновых красителей /30-31/. Поэтому мы сравнивали между собой рекомбинанты *E. coli* K12 R⁺, R-фактор к которым был перенесен от Col⁻ и Col⁺ донорных штаммов *Sh. sonnei* (табл. 2). В обоих случаях сохранялась вышеуказанная тенденция, хотя в последнем случае (Col⁺ доноры) она была еще более выражена. Резистентность к акрифлави-ну нельзя, видимо, связывать с прямым

Чувствительность штаммов-рекомбинантов *E. coli* K12 R⁺
к акрифлазину

Штамм бактерий	Всего	Чувствительность штаммов бактерий к акрифлазину*			
		чувстви- тельность	%	средние по резистент- ности	вносокре- % вистентные
Реципиент <i>E. coli</i> K12 R ⁻	I	+	-	-	-
<i>E. coli</i> K12 R ⁺	464	79	17,0	282	60,8
а) донор <i>Sh. sonnei</i> Col ⁻	303	67	22,2	178	58,7
б) донор <i>Sh. sonnei</i> Col ⁺	161	12	7,5	104	64,6
в) R ⁺ Col ⁺ рекомбинанты	16	4		9	
					3
					22,2
					19,1
					27,9

* Чувствительные - не растут или растут только при концентрации акрифлазина 100 мкг/мл; средние по резистентности - растут при концентрации акрифлазина 200-300 мкг/мл; вносокревистентные - растут при концентрации акрифлазина 300-400 мкг/мл

влиянием различных Col-факторов, так как и из 16 рекомбинантов *E. coli* R⁺Col⁺ были чувствительны к его действию.

Далее, из 464 R⁺ штаммов-рекомбинантов изучались 44, т.е. 22 пары рекомбинантов, несущие 22 различных по происхождению R-факторов. Эти пары рекомбинантов различались между собой в наибольшей степени. Часть из них были высокочувствительны, а другие - высокорезистентные к действию акрифлавина.

В дальнейших исследованиях при изучении чувствительности к акрифлавину применялся только метод градиента концентрации к нему. Этот метод оказался довольно чувствительным. Из 44 изученных R⁺рекомбинантов I штам, как и контрольный штам *E. coli* KI2 R⁻, почти не рос, у 9 имелся рост на протяжении 2 см, а у других больше, в том числе у 3 рекомбинантов, которые росли на протяжении всей чашки (9 см). Выяснилось, что в 9 случаях из 22 два рекомбинанта из одного и того же скрещивания различались по чувствительности к акрифлавину (табл.3)

Т а б л и ц а 3
Различия чувствительности к акрифлавину R⁺
рекомбинантов *E. coli* KI2 несущих одинаковые
R-факторы

№ п/п	R ⁺ рекомбинанты штамма <i>E. coli</i>		Тип R-фактора*	Коли- тинно- ген- ность	Протяжение рос- та в см при концентрации акрифлавина 0-400 мкг/мл
	Номер R-фактора	Реком- бинант			
I :	2	3	4	5	6
	R ⁻		-	-	2,5-2,5**
I	RI32	a b	Sm.Cm.Tc Sm.Cm.Tc	- -	2,5-0,5 2,5+1
2	RIV41	a b	Sm.Cm.Tc Sm.Cm.Tc	- -	2,5+0,5 2,5+2,5
3	RIV132	a b	Sm.Cm.Tc Sm.Cm.Tc	+ +	2,5+1 2,5+3,5
4	RVII124	a b	Cm Cm	+ +	2,5-1,5 2,5+4
5	RVIII362	a b	Sm.Cm.Tc Sm.Cm.Tc	- -	2,5+2,5 2,5-2,5**

I :	2	:	3	:	4	:	5	:	6
6	RXI389		a		Sm.Cm.Tc		-		2,5
			b		Sm.Cm.Tc		-		2,5+6,5
7	RXII326		a		Sm.Cm.Tc		-		2,5+3
			b		Sm.Cm.Tc		-		2,5-0,5
8	RXII356		a		Sm.Cm.Tc		-		2,5+2
			b		Sm.Cm.Tc		-		2,5-2
9	RXIII395		a		Sm.Cm.Tc		-		2,5+0,5
			b		Sm.Cm.Tc		-		2,5-0,5

* Гены резистентности к стрептомицину (Sm), хлорамфениколу (Cm) и тетрациклину (Tc)

* *Рост на протяжении меньше 3 мм

Как видно из данных, приведенных в таблице 3, в случаях I-3 и 9 разница между рекомбинантами была I-2,5 см, в случаях 7 и 8 - около 4 см, а в случаях 4-6 - от 5 до 6,5 см. Интересно отметить еще то, что только I штамм - E. coli K12 RVIIIb362, имел такую же чувствительность, как реципиент E. coli K12 R⁻, в то время как другой рекомбинант - E. coli K12 RVIIIa362 - из этого же скрещивания был высокорезистентным по отношению к акрифлавины. Следовательно, хотя данные опытов и подтверждают, что R-факторы часто вызывают повышение резистентности к акрифлавины у чувствительного штамма-реципиента E. coli K12 R⁻, этот признак не всегда является постоянным.

Во второй серии опытов применялись разные по чувствительности к акрифлавины штаммы-реципиенты E. coli при изучении влияния R-факторов на чувствительность к акрифлавины этих штаммов (табл. 4-6).

В процессе конъюгации от 4 донорных штаммов перенесли различные R- и Col-факторы на чувствительный к акрифлавины штамм E. coli OIII (табл. 4). Выяснилось, что R⁺ рекомбинанты E. coli OIII приобрели почти такой же уровень резистентности к акрифлавины, какой имели R⁺ донорные штаммы. Только в случае R25-фактора один R⁺ рекомбинант оставался чувствительным к действию акрифлавины, а у других 4 R⁺ рекомбинантов наблюдалось повышение резистентности в меньшей мере, чем

Т а б л и ц а 4

Влияние R и Col-факторов на чувствительность
штамма-реципиента E. coli 0111 к акрифлавину

№ п/п	Штаммы бактерий E. coli	Число R ⁺ ре- комби- нантов	Протяжение роста в см при концен- трации акрифла- вина 0-400 мкг/ мл.
	0111 R ⁻ Col ⁻		2,5-2,5 *
I	K12 W1485 R ⁻ R3ColE2+ColIb 0111 R3 Col ⁺	5	2,5+0,5 2,5
2	K12 R678 R3ColE1+ColE2+ColIb 0111 R3Col ⁺	I 3	2,5+0,5 2,5 2,5+0,5
3	K12W1655 F ⁺ R2ColE1 0111 R2Col ⁺	I 2	2,5-0,5 2,5 2,5+0,5
4	K12 W1485 F ⁻ R25Col ⁻ 0111 R25Col ⁻	I 4	2,5+I 2,5-2,5 * 2,5-0,5

* Рост микробов на протяжении меньше 3 мм

в случае других R-факторов. В отличие от других, в этом скрещивании у нас все штаммы были неколициногенные.

При передаче R-факторов RV67, RХIIb326 и RХIIb328 от чувствительных к акрифлавино штаммов-доноров E. coli K12 R⁺ на реципиентный штамм E. coli K12 W3876, который имел среднюю резистентность к акрифлавино (2,5 см), у рекомбинантов наблюдалось повышение резистентности (табл. 5 № I-3). В случае передачи RХ382-фактора штамма E. coli K12 на реципиент E. coli K12 W3876 наблюдалось повышение резистентности к акрифлавино у R⁺ рекомбинантов, хотя донорный и реципиентный штаммы имели одинаковую резистентность к акрифлавино. При передаче R-факторов RХIIa326, RVII156, RХIb389, RХVI546 от высокорезистентных штаммов-доноров E. coli K12 R⁺ на реципиентный штамм E. coli K12 W3876 наблюдалось повышение резистентности к акрифлавино у R⁺ рекомбинантов, хотя в случае передачи RVII156-фактора это было менее выра-

Т а б л и ц а 5
Влияние R- и Col-факторов на чувствительность
штаммов-реципиентов E.coli K12 W3876 и E.
coli K12 F678 F⁻ к акрифлавину

№ п/п	Штаммы бактерий E. coli	Число R ⁺ ре- комби- нантов	Протяжение роста в см при concentra- ции акрифлавина 0-400 мкг/мл	
I :	2	:	3 :	4
	W3876 R ⁻			2,5
I	RV67			2,5-2,5 *
	W3876 RV67	I		2,5+I
	" "	2		2,5+I,5
	" "	2		2,5+2
	" "	4		2,5+3
2	RXIIb326			2,5-0,5
	W3876 RXIIb326	2		2,5+2
	" "	2		2,5+2,5
	" "	I		2,5+3
3	RXIIIb328			2,5-2,5 *
	W3876 RXIIIb328	I		2,5+I
	" "	2		2,5+I,5
	" "	2		2,5+2
4	RX382			2,5+2
	W3876 RX382	I		2,5+2
	" "	2		2,5+2,5
	" "	I		2,5+3
5	RXIIa326			2,5+3
	W3876 RXIIa326	2		2,5+2
	" "	2		2,5+2,5
	" "	I		2,5+3
6	RVIII36			2,5+2,5
	W3876 RVIII36	I		2,5+0,5
7	RXIb389			2,5+6,5
	W3876 RXIb389	I		2,5+6,5

I :	2	:	3	:	4
8	RXVI546				2,5+6,5
	W3876 RXVI546		I		2,5+6,5
	P678 R ⁻				2,5
9	RXIb389				2,5+6,5
	P678 RXIb389		I		2,5+6,5
10	RXVI546				2,5+6,5
	P678 RXVI546		I		2,5+6,5
11	P678 R2ColE1		I		2,5+0,5
	P678 R2Col ⁻		I		2,5+0,5
12	P678 R3ColE1+ColE2+ColIb		I		2,5+0,5
	P678 R3ColE2+ColIb		I		2,5
13	P678 R25Col ⁻		I		2,5+0,5
14	P678 R26ColA+ColE1		I		2,5+0,5

* Рост микробов на протяжении меньше 3 мм

жено (табл. 5 № 4-8). Интересно отметить, что при передаче факторов RXIb389 и RXVI546 от доноров E. coli K12 R⁺ на реципиентный штамм E. coli K12 P678 наблюдалось такое же повышение резистентности к акрифлавины, какое было в случае реципиента E. coli K12 W3876 (табл. 5 № 7-8 и 9-10). При этом оба реципиента имели одинаковый уровень резистентности к акрифлавины (2,5 см).

С другой стороны, при передаче R-фактора RXII326 от двух R⁺ рекомбинантов E. coli K12 RXIa326 и E. coli K12 RXIb326, которые резко отличались по резистентности к акрифлавины, на штамм-реципиент E. coli K12 W3876, в обоих случаях наблюдалось одинаковое повышение резистентности (табл. 5 № 2 и 5). При изучении чувствительности к акрифлавины музейных культур E. coli P678, несущих R-факторы R2, R3, R25 и R26, наблюдалось незначительное повышение резистентности к акрифлавины по сравнению с первоначальным штаммом E. coli K12 P678.

При передаче R25-фактора от штамма E. coli K12 P678 R25Col⁻ на высокорезистентный к акрифлавины реципиент E.

coli HfrH у R⁺ рекомбинантов повышался уровень резистентности к акрифлавину (табл. 6). В случае высокорезистентного штамма-реципиента E. coli K12 W1485 F⁻R⁻, у музейных куль-

Т а б л и ц а 6

Влияние R- и Col-факторов на чувствительность штаммов-реципиентов E. coli HfrH и E. coli K12 W1485 F⁻ к акрифлавину

№ п/п	Штаммы бактерий E. coli K 12	Число R ⁺ ре- комби- нантов	Протяжение роста в см при конце- трации акрифлави- на на 0-400 мкг/мл
	P678 R25 Col ⁻ HfrH		2,5+0,5 2,5+I,5
I	HfrH R25 " "	2 I	2,5+2,5 2,5+3
	W1485 F ⁻ R ⁻		2,5+2
2	W1485 R2ColE1 W1485 R2Col ⁻	2 I	2,5+0,5 2,5+0,5
3	W1485 R3ColE2+ColIb W1495 R3ColE1+ColE2+ColIb	I I	2,5+0,5 2,5+0,5
4	W1485 R12Col ⁻ " "	I I	2,5-2,5* 2,5+I
5	W1485 R25Col ⁻ " "	I I	2,5 2,5+I
6	W1485 R26Col1A+ColE1	2	2,5+0,5
7	W1485 R37Col ⁻	I	2,5+I

* Рост микробов на протяжении меньше 3 мм

тур, несущих R-факторы R2, R3, R12, R25, R26, R37, наблюдалось некоторое снижение уровня резистентности к акрифлавину. Только один рекомбинант - E. coli K12 W1485 R12Col⁻ был высокочувствительным к акрифлавину. В этих опытах влияния Col-факторов на резистентность к акрифлавину R⁺ штам-

мов бактерий не наблюдалось.

При определении чувствительности к акрифлави́ну штаммов Фредерика выяснилось, что она колеблется в широких пределах. После передачи R222-фактора в процессе конъюгации на эти Col⁺ штаммы у R⁺Col⁺ рекомбинантов резистентность к акрифлави́ну во многих случаях повышалась или оставалась на первоначальном уровне (табл. 7).

Т а б л и ц а 7

Влияние R222-фактора на чувствительность
штаммов Фредерика к акрифлави́ну

№ п/п	Штаммы бактерий	Число R ⁺ ре- комби- нантов	Протяженность роста в см при концентрации ак- рифлави́на 0-400 мкг/мл
I :	2	: 3 :	4
	E. coli CSH2-R222 Col ⁻		2,5+3
	E. coli K12 P678 R222Col ⁻		2,5+3
I	E. coli CA-7 R ⁻ ColV		2,5-0,5
	E. coli CA-7 R222ColV	2	2,5-I
	" "	I	2,5-0,5
2	E. coli CA-18 R ⁻ ColB		2,5-2,5 * *
	E. coli CA-18 R222ColB [±]	2	2,5+2,5
3	E. coli CA-23 R ⁻ ColD		2,5+3
	E. coli CA-23 R222ColD	2	2,5+2
	" " "	2	2,5+2,5
	" " "	3	2,5+3
4	E. freundii CA-31 R ⁻ ColA		2,5-2,5 * *
	E. freundii CA-31 R222ColA [±]	I	2,5-I
	" " "	I	2,5+I,5
5	E. coli CA-38 R ⁻ ColE3+ColIb		2,5+6,5
	E. coli CA-38 R222ColE3+ColIb [±]	I	2,5+3
	" " "	3	2,5+4
	" " "	I	2,5+6,5
6	E. coli CA-42 R ⁻ ColE2		2,5-2,5 * *
	E. coli CA-42 R222ColE2 [±]	5	2,5+0,5

1 :	2	3 :	4
7	<i>E. coli</i> CA-46 R ⁻ ColG		2,5-2
	<i>E. coli</i> CA-46 R222ColG	I	2,5-I
	" " "	I	2,5-0,5
8	<i>E. coli</i> CA-58 R ⁻ ColH		2,5+I,5
	<i>E. coli</i> CA-58 R222ColH	I	2,5+I
	" " "	I	отдельные колонии
9	<i>E. coli</i> CA-62 R ⁻ ColE1+ColIa		2,5-0,5
	<i>E. coli</i> CA-62 R222ColE1+ColIa	I	2,5-I
	" " "	2	2,5-I,5
	" " "	2	2,5-2
10	<i>E. coli</i> K235 R ⁻ ColK		2,5-2,5 **
	<i>E. coli</i> K235 R222ColK*	2	2,5-2,5 **
	" " "	I	2,5+3
	" " "	3	2,5+4
	" " "	I	2,5+6,5
II	<i>Sh. sonnei</i> P9 R ⁻ ColE2+ColIb		2,5
	<i>Sh. sonnei</i> P9 R222ColE2+ColIb	2	2,5+0,5
12	<i>Sh. dispar</i> P14 R ⁻ ColE1		2,5+I
	<i>Sh. dispar</i> P14 R222ColE1	2	2,5+I
	" " "	I	2,5+I,5
	" " "	2	2,5+2,5
13	<i>Sh. dispar</i> P15 R ⁻ ColS4		2,5
	<i>Sh. dispar</i> P15 R222ColS4	I	2,5-I
	" " "	I	2,5+I

* Факторы колициногенности фенотипически не проявлялись

** Рост микробов на протяжении меньше 3 мм

Повышение резистентности к акрифлавину было больше в случае высокочувствительных R⁻Col⁺ штаммов. Только в случае рекомбинантов *E. coli* CA-62 R222ColE1+ColIa наблюдалось снижение резистентности к акрифлавину.

Для выяснения возможной роли Col-факторов при повышении резистентности к акрифлавину были селектированы варианты

[illegible]

и чувствительность к сульфанидам (Bo) не различается

Исучены после 2-месячного хранения культуры — СО-П-1-ИВ

1. Вопросы, связанные с деятельностью органов государственной власти:

Таблица 3

Сравнения чувствительности и аффинности K^+ катион сенсоров
и их K^+ сепараторов

№ п/п	K^+ равновесия катион	Протяжение роста и см при концентрации аффинности 0-400 мкг/мл			
		K^+ культуры		K^+ сепараторы, микропрошито	
		перед началом	после 10 часов	после 1 часа	после 10 часов
	$N. coli K12$				
	W3876 K^+	2,5			
I	W3876 NV67(8m.Cm.Tc)Col ⁻	2,5+2	2,5+3,5	2,5-2,5 (1) [*] 2,5 (2) 2,5+1,5 (1)	2,5+3,5 (1) [*]
2	W3876 NV1156(8m.Cm.Sc)Col ⁺	2,5+0,5	2,5+1	2,5+2,5 (1) 2,5+3,5 (1) 2,5+4 (1)	2,5+3 (2) 2,5+4 (1) 2,5+6 (1)
3	W3876 NX382(8m.Cm.Tc)Col ⁻	2,5+3	2,5+6	2,5-1 (1) 2,5-0,5 (3) 2,5 (2) 2,5+0,5 (2) 2,5+1 (1)	2,5+4 (1) 2,5+6 (6)
	K^+	2,5-2,5			
4	NX382(8m.Cm.Tc)Col ⁻	2,5+2	2,5+6	-	2,5+3,5 (1) 2,5+5 (1)
5	NX1b389(8m.Cm.Tc)Col ⁻	2,5+6,5	2,5+6,5	-	2,5-2,5 (2)
6	W3876 NX1b389(8m.Cm.Tc)Col ⁻	2,5+6,5	2,5+6,5	-	2,5+6,5 (2)
7	NX11a356(8m.Cm.Tc)Col ⁻	2,5+2	2,5+6	-	2,5+1,5 (1)
	F678 K^+	2,5			
8	F678 NX11a356(8m.Cm.Tc)Col ⁻	2,5+3	2,5+6,5	-	2,5-1 (1) 2,5+2 (1) 2,5+3 (2) 2,5+6,5 (4)
9	NX11b326(8m.Cm.Tc)Col ⁻	2,5-0,5	2,5+1	-	2,5+1 (1) 2,5+2 (3) 2,5+3 (3)
10	NV1b12+(Cm)Col ⁺	2,5+4	2,5+4,5	2,5-2,5 (1)	-
11	CSE2-R222(8m.Cm.Tc.Su)Col ⁻	2,5+3	2,5-0,5	2,5+0,5 (1) 2,5+1 (2)	-
12	$N. coli$ GA-18 R222ColB	2,5+2,5	2,5+3,5	2,5+1 (3)	-
13	$N. coli$ GA-42 R222ColB2	2,5+0,5	2,5+3,5	-	2,5 (1) 2,5+1 (1) 2,5+1,5 (2) 2,5+2 (4) 2,5+2,5 (3)

* Число K^+ сепараторов

штамма *E. coli* 32 /26/: R38ColE1+ColA+Col1b, R⁻ColE1+ColA+Col1b, R38Col⁻ и R⁻Col⁻. Оказалось, что все эти штаммы имели одинаковый уровень резистентности к акрифлавину (2,5+0,9 см). Сказанное подтверждается и данными, приведенными в таблице 6, при изучении штаммов *E. coli* K12 W1485 R⁻R2ColE1 и H20Col⁻.

В третьей серии опытов с целью элиминации R-факторов под действием акрифлавина (20 мкг/мл) было изолирование R⁻ сегрегантов для сравнения их резистентности к акрифлавину с первоначальными R⁺ штаммами бактерий. Поэтому в таблице 8 не приведены контрольные опыты, где изучалась спонтанная частота элиминации R-факторов. В последнем случае нам удалось найти только отдельные R⁻ сегреганты.

После 24-часовой инкубации R⁺ штаммов в среде с акрифлавином элиминация R-факторов или отдельных r-генов R-фактора происходила только в некоторых случаях и с очень низкой частотой (табл. 8). Только при изучении штамма Ватанабе *E. coli* K12 CSH2-R222 в опыте все изученные 300 колоний были почему-то чувствительны к стрептомицину и хлорамфениколу. После 10 пассажей изученных культур в среде с акрифлавином число R⁻ сегрегантов значительно не повышалось. Кроме этого, число R⁻ сегрегантов не было выше и у R⁺-штаммов, которые были высокочувствительны к акрифлавину. В 7 случаях определяли R⁻ сегреганты у опытных R⁺ культур после 2-месячного хранения в мясо-пептонном бульоне. Положительные результаты были получены в 3 случаях. Надо еще отметить, что в большинстве случаев элиминировались только отдельные r-гены R-фактора.

При сравнении чувствительности к акрифлавину у I3 R⁺ штаммов бактерий и их R⁻ сегрегантов выяснилось, что из 68 у 41 уровень резистентности к акрифлавину снизился, у I3 остался на уровне контроля и у I3 повышался (табл. 9). Повышение резистентности к акрифлавину происходило в случае R-факторов RV1156 и RX11b326. Из данных, приведенных в таблице 9, вытекает, что пассирование R⁺ культур в среде с акрифлавином вызвало повышение резистентности к акрифлавину, за исключением штамма *E. coli* K12 CSH2-R222.

Обсуждение

Под действием акридиновых красителей бактерии, несущие эписомы резистентности, теряют эти эписомы /7-10/, однако иногда данный феномен не обнаруживается /17-19/.

В наших более ранних исследованиях /26,32/ опыт элиминации R-факторов под действием акрифлавина давал у одних штаммов энтеробактерий положительные, у других - отрицательные результаты. В этих опытах воздействие акрифлавина было связано с предварительной обработкой культур облучением ультрафиолетовыми лучами, так как последнее вызывает повышение частоты элиминации R-факторов /7-8/. На основании этих данных мы предполагали /26/, что некоторые R-факторы могут иметь гены, детерминирующие устойчивость к акрифлавиному, аналогично генам $asx A^+$, находящимся в хромосоме бактерий /20/.

При изучении влияния различных R-факторов на чувствительность к акрифлавиному штаммов-реципиентов после приобретения R-факторов выяснилось, что уровень резистентности к акрифлавиному во многих случаях повышается. С другой стороны, у R⁻ сегрегантов резистентность к акрифлавиному обыкновенно снижается. Следовательно, в отличие от литературных данных /15-16/, присутствие R-факторов в клетке вызывает не снижение, а повышение резистентности к акрифлавиному. Такое повышение резистентности происходит все же не во всех случаях. Поэтому наши данные еще не доказывают, что в составе R-факторов имеются гены, определяющие резистентность (или чувствительность) к акрифлавиному. Повышение резистентности можно связать с активностью генов R-фактора, которые определяют репликацию R-факторов, синтез цитоплазматического репрессора или изменения в структуре плазматической мембраны клетки.

В предыдущей работе мы не определяли спонтанной частоты элиминации R-факторов. Под действием акрифлавина, без предварительной обработки ультрафиолетовыми лучами удалось изолировать только отдельные R⁻ сегрегаты. Это было и в случаях применения высокочувствительных к акрифлавиному R⁺ штаммов. При этом часто элиминировались только отдельные гены R-фактора, что совпадает со многими литературными данными /9,33-34/. Многократные пассажи R⁺ культур в среде

с акрифлавином тоже не повышали резистентности к акрифлави-ну у изученных микробных культур. Из этого следует, что R^- сегреганты, наверное, не имеют селективного преимущества в среде с акрифлавином. Подтвердились и наши более ранние дан-ные /26/, что отсутствие элиминации R -факторов акрифлави-ном не обусловлено наличием Col -факторов в бактериальных клетках R^+Col^+ .

Суммируя все факты, приведенные выше, можно заключить, что отсутствие элиминации R -факторов связано как с генети-ческой структурой R -факторов, так и многими свойствами бактерий-хозяев, а также с условиями культивирования микро-бов. Однако эти вопросы требуют еще дальнейшего изучения.

Выводы

1. После приобретения R -факторов большинство R^+ реком-бинантных штаммов становятся более резистентными к акрифла-вину, а после элиминации R -фактора или отдельных r -генов - более чувствительными.

2. Большинство R -факторов не элиминируются под дейст-вием акрифлавина. Это не связано с резистентностью к акри-флавиноу R^+ культур.

3. Пассажи R^+ штаммов в бульоне с добавлением акрифлави-на не повышают частоты элиминации R -факторов, но увеличи-вает резистентность к акрифлавиноу у микробных культур.

4. Col -факторы не изменяют уровня резистентности к акри-флавиноу R^+ культур и частоты элиминации R -факторов.

Л и т е р а т у р а

1. Кудлай Д.Г., Чубуков В.Ф., Оганесян М.Г. Генетика лекар-ственной устойчивости бактерий. М., 1972.
2. Hirota, Y. The effect of acridina dyes on mating type factors in *B. coli*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1960, 46, 1, 57-64.
3. Jacob, F., Brenner, S., Cuzin, F. On the regulation of the DNA replication in bacteria. Cold Spring Har- bour Symp. Quant. Biol. 1963, 28, 329-348.

4. Guzin, F., Jacob, F. Inhibition par les acridines du transfert genetique par les souches donatrices d'*Escherichia coli* K-12. Ann. Inst. Pasteur, 1966, 111, 427-436.
5. Grindley, J.N., Grindley, N.D.F., Anderson, E.S. Acridine treatment of F⁺ and Hfr strains of *E. coli* K12 carrying a neomycin-kanamycin resistance determinant. Genet. Res., 1970, 15, 3, 327-334.
6. Yamagata, H., Uchida, H. Effect of acridine orange on sex factor multiplication in *E. coli*. J. Mol. Biol., 1969, 46, 1, 73-64.
7. Mitsuhashi, S., Harada, K., Kameda, M. Elimination of transmissible drug resistance by treatment with acriflavine. Nature, 1961, 189, 4768, 947.
8. Watanabe, T., Fukasawa, T. Episome-mediated transfer of drugresistance in Enterobacteriaceae. II Elimination of resistance factors with acridines. J. Bacteriol., 1961, 81, 5, 679-683.
9. Vondrášková, M., Starka, J. Множественно резистентные штаммы *Escherichia coli*, выделенные из мочеполового тракта. Х. гигиены, эпидемиол., микробиол., иммунол., 1966, 10, 2, 166-169.
10. Salisbury, V., Hedges, B.W., Datta, N. Two modes of curing transmissible bacterial plasmids. J. gen. Microbiol., 1972, 70, 3, 443-452.
11. Nakamura, H. Genetic determination of resistance to acriflavine, phenyl alcohol and sodium dodecyl sulfate in *E. coli*. J. Bacteriol., 1968, 96, 4, 987-996.
12. Hakamura, H., Suganuma, A. Membrane mutation associated with sensitivity to acriflavine in *E. coli*. J. Bacteriol., 1972, 110, 1, 329-335.
13. Yoshikawa, M. Drug sensitivity and mutability to drug resistance associated with the presence of an R-factor. Genet. Res., 1971, 17, 3, 1-7.
14. Akiba, T. Studies on the transfer of drug resistance. J. Bacteriol., 1962, 17, 497.

15. Yoshikawa, M. Sevag, N.G. Sensitivity of *E. coli* to atabrine conferred by R-factor and its potential clinical significance. *J. Bacteriol.*, 1967, 93, 1, 245-253.
16. Yoshikawa, M. Selective enrichment of R⁻ segregants as the main mechanism of curing the R-factor by acridine dyes. *Genet. Res.*, 1971, 17, 1, 9-16.
17. Meynell, E., Meynell, G.G., Datta, N. Phylogenetic relationship of drug resistance factors and other transmissible plasmids. *Bacteriol. Rev.*, 1968, 32, 1, 51-83.
18. Novick, R.P. Extrachromosomal inheritance in bacteria. *Bacteriol. Rev.*, 1969, 33, 2, 210-235.
19. Mitsuhashi, S. The R factors. *J. Inf. Dis.*, 1969, 119, 1, 89-100.
20. Nakamura, H. Gene-controlled resistance to acriflavine and other basic dyes in *E. coli*. *J. Bacteriol.*, 1965, 90, 1, 8-14.
21. Davis, B.D., Mingioli, E.S. Mutants of *Escherichia coli* requiring methionine or vitamin B12. *J. Bacteriol.*, 1950, 60, 1, 17-28.
22. Otte, H.J., Köhler, W. In: *Die Praxis der Resistenz und Spiegelbestimmungen zur antibiotischen Therapie*. Jena, 1958, 82-126.
23. Хейнару А.Л., Лейе К.Е., Илзе Т.А., Кихо С.К. Трансмиссивные факторы устойчивости к антибиотикам у штаммов *Sh. sonnei* с различным ферментативным типом. В кн.: Сб. докл. II респ. съезда эпидемиол., микробиол., инфекцион. и гигиены. Таллин, 1972, 122-125.
24. Таллмейстер Э.Т., Хейнару А.Л. Передача R-факторов у ниггели и кишечных палочек. *И. микробиол.*, 1969, № 7, 13-18.
25. Хейнару А.Л., Таллмейстер Э.Т. R-факторы и поведение их детерминантов у штаммов энтеробактерий различного происхождения. *Генетика*, 1971, 7, 1, 130-140.
26. Хейнару А.Л., Таллмейстер Э.Т. О взаимоотношении между колициногенностью и трансмиссивной устойчивости у штаммов *Sh. sonnei* и *E. coli*. *Генетика*, 1971, 7, 4, 101-112.

27. Хейнару А.Л., Таллмейстер Э.Т. Изучение чувствительности к колицинам у штаммов шигелл и кишечных палочек в зависимости от факторов эпизомной резистентности и колициногенности или S—R форм диссоциации. Генетика, 1971, 7, 5, 113-122.
28. Fredericq, P. Action antibiotiques réciproques chez les Enterobacteriaceae. Rev. Belge Path. Med. Exptl., 1948, 19, Suppl. 1, 1-107.
29. Lederberg, J., Lederberg, E.M. Replica plating and indirect selection of bacterial mutants. J.Bacteriol., 1952, 63, 3, 399-406.
30. Fredericq, P. Colicines et colicinogénie. Ann. Inst. Pasteur, 1964, 107, Suppl. 5, 7-17.
31. Nomura, M. Colicins and related bacteriocins. Ann. Rev. Microbiol., 1967, 21, 257-284.
32. Таллмейстер Э.Т., Хейнару А.Л. Комплексная резистентность к антибиотикам у штаммов кишечных палочек, выделенных из кала больных дизентерией. Уч. зап. Тартуского гос. ун-та, 1969, 249, 175-178.
33. Kétyi, I., Vertényi, A. Segregation of R factor in Shigella after acridine orange treatment. Acta microbiol. Acad. scient. hung., 1967, 14, 2, 181-187.
34. Iyer, R.V., Iyer, V.N. Genetic and molecular proprieties of an infectious antibiotic resistance (R) factor isolated from Klebsiella. J. Bactériol., 1969, 100, 2, 605-616.

The Resistance to Acriflavine of R^+ and R^- Strains
of Bacteria and the Elimination of R-Factors

A. Heinaru, T. Ilus

S u m m a r y

The resistance to acriflavine in 657 R^+ recombinants of 18 strains of *Escherichia coli* carrying 233 R-factors of different origin was studied.

It was discovered that after the transfer of R-factors by conjugation the R^+ recombinants were mostly more resistant to acriflavine than R^- strains of *E. coli*. At the same time the elimination of R-factors or a few r-genes lowered the degree of resistance to acriflavine of the strains.

The influence of acriflavine upon the elimination of 11 different R-factors in 28 strains of *E. coli* was observed. In most cases no elimination of R-factors was noticed. It was found that the frequency of elimination of R-factors with acriflavine depended neither on the degree of resistance to acriflavine of the R^+ strains nor the number of repeated passages of the R^+ subcultures on nutrient media with acriflavine, although in the latter case the resistance to acriflavine of the strains increased.

It was found that Col-factors change neither the resistance to acriflavine of R^+ strains nor the degree of elimination of R-factors.

СОДЕРЖАНИЕ

М. В и й к м а а. О цитологической реактивности влагалищного эпителия в тканевой культуре ..	3
M. V i i k m a a. On Cytological Reactivity of Vaginal Epithelium in Tissue Culture. Summary.	15
М. В и й к м а а. Характеристика экспериментально вызванных альтернативных дифференцировок влагалищного эпителия крыс	16
M. V i i k m a a. Characteristics and Factors of Alternative Differentiation of Vaginal Epithelium. Summary.	30
Х. К а л л а к, Ю. К а а р е п. Цитогенетическая характеристика действия 2,4-Д на каллус- ные ткани <i>Harporarpus gracilis</i>	32
H. K a l l a k, U. K a a r e p. On Cytogenetic Characterization of 2,4-D Action on the Callus Tissues of <i>Harporarpus gracilis</i> . Summary.	51
Х. К а л л а к, Л. Я р в е к ю л ь г. О морфоло- гии и делении ядер растительных клеток в условиях культуры ткани	52
H. K a l l a k, L. J ä r v e k ü l g. On Nuclear Form and Division in Plant Tissue Culture. Summary.	63
Ю. К я р н е р. Морфология лизосом в культивиро- ванных фибробластах эмбрионов курицы	64
J. K ä r n e r. The Fine Structure of Chicken Fibroblast Lysosomes in Primary Tissue Cultures. Summary.	73
Ю. К я р н е р. О двух формах локализации криномы в куриных культивированных фибробластах ...	74
J. K ä r n e r. Crinome in the Chicken Fibroblasts of Primary Tissue Cultures. Summary.	83

А. П и й р с о о. Макрофаги в тканевых культурах селезенки и мягких мозговых оболочек	84
A. P i i r s o o. Macrophages in Tissue Cultures of Spleen and Leptomeninges. Summary.	94
А. Х е й н а р у, Т. И л у с. О чувствительности к акрифлавину R^+ и R^- штаммов бактерий и элиминация R-факторов	85
A. H e i n a r u, T. I l u s. The Resistance to Acriflavine of R^+ and R^- Strains of Bacteria and the Elimination of R-Factors. Summary.	117

О цитологической реактивности влагалищного эпителия в тканевой культуре. Вийкмаа М. Уч. зап. Тартуского гос. ун-та, вып. 383. Труды по цитологии и генетике I, 1976, с. 3-14.

Изучались морфологические и цитохимические реакции эпителиальных клеток в однослойной зоне роста культур влагалищных эксплантатов I - 2-недельных щенков.

В присутствии эстрогена (0,2 мкг/мл) повышалась анаболическая активность, а в присутствии витамина А (10 ед./мл) катоболическая активность клеток культуры. Кратковременное (10 - 24 часа) действие как эстрогена, так и витамина А стимулировало, а более длительное действие их подавляло митотическую активность культур.

Длительное действие витамина А и охлаждение вызывали в принципе одинаковые паранекротические и деструктивные изменения в клетках культуры, связанные с сильным повреждением лизосом и появлением диффузного распределения активности кислой фосфатазы.

Гидрокортизон (10 мкг/мл) предохранял клетки от нарушений лизосом и паранекротических изменений, и подавлял повышение митотической активности после охлаждения.

Полученные данные согласуются с положениями, по которым состояния лизосом имеют значительную роль во внутриклеточных процессах деструкции и репарации, а также в регуляции митотической активности клеток.

Библ.-34; рис.-10.

Характеристика экспериментально вызванных альтернативных дифференцировок влагалищного эпителия у крыс.
Вийлмаа М. Уч. зап. Тартуского гос. ун-та, вып. 383,
Труды по цитологии и генетике I, 1976, с.16-29.

Изучались морфологические и гистохимические изменения, связанные с альтернативной дифференцировкой влагалищного эпителия при действии различных веществ. Опыты выполнялись на 166 белых крысах-самках (среди них кастрированные, неполовозрелые и взрослые нелактирующие особи).

При подкожном введении витамина А, прогестерона, тестостерона или прогестерона с эстрогеном обнаруживается повышение пролиферации базальных клеток и развитие гиперпластического, слизистого цилиндрического эпителия. При этом наблюдается усиление диффузной активности кисломолочного фермента кислой фосфатазы, прежде всего в базальном слое. Эстроген вызывает ороговение эпителия, связанное с интенсивной пролиферацией и гиперплазией, а гидрокортизон - ороговение со слабовыраженной пролиферацией и гиперплазией. Гидрокортизон, кроме того, подавляет муцифицирующее действие прогестерона. В ороговеющем эпителии обнаруживается слабая гранулярная активность кислой фосфатазы в базальных слоях и постепенное понижение содержания ДНК и РНК в надбазальных слоях.

Предлагается гипотеза по механизмам альтернативной дифференцировки влагалищного эпителия, по которой направление дифференцировки клеток определяется на посттранскрипционном уровне.

Библи.-32, табл.-2, рис.-10.

УДК 581.1.035.23: 576.3.088

Цитогенетическая характеристика действия 2,4-Д
на каллусные ткани *Harporaria gracilis*.
Каллак Х., Каарен Ю. Уч. зап. Тартуского гос.
ун-та, вып. 383. Труды по цитологии и генетике I,
1976, с. 32-50.

В статье представлены данные дифференциальной резистентности трех штаммов каллусной культуры гаплопаппуса в отношении 2,4-Д в среде питания (в концентрации 1, 5, 10, 20 и 50 мг/л) и корреляция этой резистентности с темпом роста и частотой хромосомных aberrаций соответствующих штаммов. Мутагенный эффект 2,4-Д на хромосомном уровне (в степени ploидности и частоте aberrаций) или отсутствует или проявляется в усилении характерной для данного штамма изменчивости хромосомных наборов. Как гербицидное, так и мутагенное действия 2,4-Д имеют кумулятивный характер (проявляются сильнее при повторном воздействии).

Табл. - 7; библ. - 33 назв.

О морфологии и делении ядер растительных клеток
в условиях культуры ткани. Каллак Х., Ярвекюльг Л.
Уч. зап. Тартуского гос. ун-та, вып. 383. Труды по
цитологии и генетике I, 1976, с. 53-62.

В статье изложены данные о разнообразии формы и величины ядер в каллусных клетках гороха, гаплопаппуса и табака. В этих культурах наряду с шарообразными ядрами нередко встречаются разные полиморфные ядра. Основным способом деления ядер исследованных каллусных клеток является митоз, хотя с разными отклонениями (сегрегация хромосом в метафазе, неправильное распределение хроматид в анафазе, К-митозы и др.). Кроме митозов появляются также амитозы и фрагментации ядер. Описанные особенности в морфологии и делении ядер каллусных клеток связываются с сверхмерной репродукцией в специфических условиях культуры ткани.

Илл. - 16; библи. - 36 назв.

УДК 576.311:578.086.3

Морфология лизосом в культивируемых фибробластах эмбрионов курицы. Кярнер Ю. Уч. зап. Тартуского гос. ун-та, вып. 383. Труды по цитологии и генетике I, 1976, с. 64-72.

Описываются превращения лизосом при витальном окрашивании нейтральным красным (5 мкг/мл в течение 15 минут и 3 часов) клеток в первичных тканевых культурах и при репарации окрашенных клеток в нормальной культуральной среде. Добавление к питательной среде красителя вызывает просветление плотных телец и интенсивный аутофагоцитоз в зона Гольджи. При репарации окрашенных клеток лизосомы разлагаются или в цистерны шероховатого эндоплазматического ретикулума или в гладкие пузырьки разных размеров. Высказывается гипотеза, что клетки утилизируют материалы, накопленные в лизосомах в экстремальных условиях, а аутофагоцитоз может быть в известной мере обратимым.

Илл. - 14, библи. - 33 назв.

О двух формах локализации криномы в куриных культивированных фибробластах. Кярнер Ю. Уч. зап. Тартуского гос. ун-та, вып. 383, Труды по цитологии и генетике I, 1976, с. 74-82.

Представлена свето- и электронномикроскопическая характеристика локализации скоплений рибонуклеиновой кислоты в цитоплазме фибробластов после длительного (24-48 часов) прижизненного окрашивания нейтральным красным. При слабых концентрациях красителя (5 мкг/мл) рибонуклеиновая кислота обнаруживается в лизосомах. Анализируя результаты опытов с высокими концентрациями нейтрального красного (20 мкг/мл), автор присоединяется к мнению исследователей, которые связывают происхождение криномы с неравномерным распределением рибосом в цитоплазме сильно поврежденных клеток.

Илл. - 10, библ. - 33 назв.

Макрофаги в тканевых культурах селезёнки и мягких мозговых оболочек. Пийрсоо А. Уч. зап. Тартуского гос. ун-та, вып. 383. Труды по цитологии и генетике I, 1976, с.84-93.

Изучались кусочковые эксплантаты мягких мозговых оболочек головного мозга (30 серий) и селезёнки (10 серий) эмбрионов разных животных (свиньи, крупного рогатого скота, кролика, крысы) и курицы. Источником макрофагов в изученных культурах оказываются полибласты, которые по всей видимости представляют собой промоноциты или моноциты. Установили, что макрофаги в других изученных источниках являются весьма сходными (гистохимические свойства, образование симпластов и т.д.) и они четко отличаются от фибробластоподобных клеток.

Рис. - 19. Библ. - 27.

УДК 576.858.9.

О чувствительности к акрифлавину R^+ и R^- штаммов бактерий и элиминация R -факторов. А. Хейнару, Т. Илус. Уч. зап. Тартуского гос. ун-та, вып. 383. Труды по цитологии и генетике I, 1976, с.95-116.

Чувствительность к акрифлавину изучали у 657 R^+ рекомбинантов 18 штаммов *Escherichia coli*, несущие 233 различные по происхождению R -факторы. Выяснилось, что после приобретения R -факторов большинство R^+ -рекомбинантных штаммов становятся более резистентными к акрифлавину, а после элиминации R -фактора или отдельных r -генов - более чувствительными.

У 28 штаммов *E. coli* исследовали элиминацию 11 различных R -факторов под действием акрифлавина. Было найдено, что большинство R -факторов не элиминируются под действием акрифлавина. Это не связано с резистентностью к акрифлавину R^+ культур. Пассажи R^+ штаммов в бульоне с добавлением акрифлавина не повышают частоты элиминации R -факторов, но увеличивают резистентность к акрифлавину у культур. Выяснилось и то, что Col-факторы не изменяют уровня резистентности к акрифлавину R^+ культур и частоты элиминации R -факторов.

Библ. - 34, табл. - 9.

УЧЕНЫЕ ЗАПИСКИ ТАРТУСКОГО ГОСУДАРСТВЕННОГО
УНИВЕРСИТЕТА. Выпуск 383. ТРУДЫ ПО ЦИТОЛО-
ГИИ И ГИСТАТОЛОГИИ I. На русском языке. Резюме
на английском языке. Тартуский государст-
венный университет. ЭССР, г. Тарту, ул. Пил-
кооли, 18. Ответственный редактор К. Пилд-
вере. Корректоры В. Логинова, Х. Лийв. Сдано
в печать 07/06 1976. Бумага офсетная 30x45
1/4. Печ. листов 8,0+2,5 п.ч. вкл. Учетно-
изд. листов 8,5. Тираж 400. МВ 05280. Зак.
№ 729. Типография ТГУ, ЭССР, г. Тарту, ул.
Пялсона, 14. Цена 85 коп.